



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی قزوین

پایان نامه

جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد میکروب شناسی پزشکی

عنوان:

فراوانی اینتگرون های کلاس های ۱، ۲ و ۳ در ایزوله های بالینی با مقاومت دارویی چندگانه و مقاوم

به متی سیلین / استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان های آموزشی

قزوین و تهران

استاد راهنما: دکتر معصومه اصلانی مهر

استاد مشاور: دکتر امیر پیمانی

نگارش: معین ییلاق بیگی

شماره ثبت: ۵۷

سال فراغت از تحصیل: تابستان ۹۴-۹۳

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

..... مادر، توفیع ترین داستان حیات منی.

..... توبه من درس زندگی آموختی.

..... تو چون پروانه سوختی و چون شمع کداحتی و مهربانانه با سختی های من ساختی.

..... مادر، ستاره مانایی از نگاه توست و مهتاب پرتویی از عطوفت، و سپیده حکایتی از صداقت.

..... قلم از نگارش سگوه تو ناتوان است و هزاران شعر در سایش مدح تو اندک.

اگر نمی توانم کوشش بایت را ارج نهم و محبت بایت را سپاس گزارم،



پوزش بی کرانم را همراه با تقدیم پایان نامه ام به تو، بپذیر.

فروع تو تا انتهای زمان جاوید و روزت تا پایان روزگار،

و

همچنین پایان نامه ام را تقدیم به روح پدرم می کنم.

سرکار خانم دکتر اصلانی مهر و آقای دکتر پیمانی، اساتید راهنما و مشاورم:

لطف شما را که سرشار از عشق و یقین است. چگونه سپاس گویم تأثیر علم آموزی شما را که چراغ روشن

هدایت را بر کلبه ی محقر وجودم فروزان ساخته است. آری در مقابل این همه عظمت و شکوه شما مرا نه

توان سپاس است و نه کلام وصف

با امتنان بیکران از مساعدت های بی شائبه ی جناب آقای پروفیسور ناصر پور ریاست محترم مرکز تحقیقات

سلولی و مولکولی، مدیر گروه میکروب شناسی و معاون پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قزوین

با سپاس بی دریغ خدمت دوستان گران مایه ام خانم ها سمانه منصوری، دکتر مهناز توکلی و دکتر

رضوان یعقوب فر و

آقایان احسان زارع، مهدی محمدی و کیوان اسمعیلی که مرا صمیمانه و مشفقانه یاری داده اند.

و با تشکر خالصانه خدمت همه کسانی که به نوعی مرا در به انجام رساندن این امر مهم

یاری نموده اند.

فهرست مطالب

I-XIII	فهرست و کلیات
۱	چکیده فارسی
۲	بخش اول: مقدمه
۳	۱-۱ بیان مسئله
۷	۲-۱ تاریخچه
۸	۳-۱ ویژگی های جنس استافیلوکوک
۹	۴-۱ طبقه بندی
۱۰	۵-۱ دامنه میزبان
۱۰	۶-۱ جایگاه میکروارگانسیم
۱۳	۷-۱ متابولیسم، ویژگی های کشت و رشد
۱۵	۸-۱ روش های شناسایی
۱۵	۱-۸-۱ روش های فنوتیپی
۱۹	۲-۸-۱ روش های ژنوتیپی
۱۹	۹-۱ روش های تایپینگ / استافیلوکوکوس / اورئوس
۲۱	۱۰-۱ شاخص های بیماریزایی
۲۱	۱-۱۰-۱ آدهسین های سطحی

۲۲ ۲-۱۰-۱ کپسول
۲۳ ۳-۱۰-۱ دیواره سلولی
۲۳ ۱-۳-۱۰-۱ پپتیدوگلیکان
۲۴ ۲-۳-۱۰-۱ پروتئین A
۲۷ ۴-۱۰-۱ آنزیم های خارج سلولی
۲۸ ۵-۱۰-۱ توکسین ها
۲۹ ۱-۵-۱۰-۱ همولیزین ها
۲۹ ۲-۵-۱۰-۱ توکسین پنتون والتین
۳۰ ۳-۵-۱۰-۱ سوپرآنتی ژن ها
۳۲ ۱-۳-۵-۱۰-۱ توکسین اکسفولیاتیو
۳۳ ۲-۳-۵-۱۰-۱ توکسین سندرم شوک سمی
۳۴ ۳-۳-۵-۱۰-۱ انتروتوکسین های استافیلوکوکی
۳۴ ۱۱-۱ جزایر بیماریزایی
۳۶ ۱-۱۱-۱ جزیره مقاومت SCC mec
۳۷ ۱۲-۱ عفونت های بیمارستانی
۳۹ ۱۳-۱ آنتی بیوتیک ها و مکانیسم های مقاومت
۴۱ ۱-۱۳-۱ بتالاکتام ها

- ۱۴-۱ گلیکولیپیدها..... ۴۳
- ۱۵-۱ آمینوگلیکوزیدها..... ۴۳
- ۱۶-۱ ماکرولید - لینکوزآمید - استرپتوگرامین B..... ۴۴
- ۱۷-۱ کوئینولون ها..... ۴۵
- ۱۸-۱ تتراسایکلین..... ۴۶
- ۱۹-۱ ریفاپین..... ۴۷
- ۲۰-۱ تری متوپریم - سولفامتوکسازول..... ۴۷
- ۲۱-۱ لینوزولید..... ۴۷
- ۲۲-۱ استرپتوگرامین ها..... ۴۸
- ۲۳-۱ نقش ژن ها در مقاومت ضد میکروبی استافیلوکوکوس اورئوس..... ۴۸
- ۲۴-۱ انتقال ژن در استافیلوکوک ها..... ۴۹
- ۱-۲۴-۱ کنژوگیشن..... ۴۹
- ۲-۲۴-۱ ترانسفورمیشن..... ۵۰
- ۳-۲۴-۱ کنژوگیشن به وسیله فاژ..... ۵۰
- ۴-۲۴-۱ ترانسداکشن..... ۵۰
- ۲۵-۱ انتقال مقاومت آنتی بیوتیکی..... ۵۱
- ۲۶-۱ عناصر سیار ژنتیکی باکتریایی..... ۵۱

۵۲ ترانسپوزون ها	۲۷-۱
۵۳ اینتگرون ها	۲۸-۱
۶۲ اپیدمیولوژی	۲۹-۱
۶۳ درمان	۳۰-۱
۶۵ بخش دوم: مروری بر مطالعات	
۶۶ ۱-۲ بررسی متون	
۶۹ بخش سوم: مواد و روش ها	
۷۰ ۱-۳ اهداف و فرضیات	
۷۰ ۱-۱-۳ هدف اصلی	
۷۰ ۲-۱-۳ اهداف فرعی	
۷۱ ۳-۱-۳ اهداف کاربردی	
۷۱ ۴-۱-۳ فرضیه یا سوال های پژوهش	
۷۲ ۲-۳ مواد و روش ها	
۷۲ ۱-۲-۳ نوع مطالعه و انتخاب افراد مطالعه	
۷۲ ۲-۲-۳ معیارهای خروج از مطالعه	
۷۲ ۳-۲-۳ جامعه مورد مطالعه و روش محاسبه و نمونه گیری	
۷۳ ۳-۳ جمع آوری نمونه	

۳-۴	آزمایش های تعیین هویت ایزوله ها به روش های فنوتیپی	۷۴
۳-۵	ذخیره سازی سویه های بدست آمده	۷۹
۳-۶	تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی	۷۹
۳-۷	تعیین سویه های MSSA و MRSA	۸۱
۳-۸	تعیین الگوی مقاومت دارویی چندگانه تمامی ایزوله ها	۸۲
۳-۹	روش های تشخیص مولکولی	۸۲
۳-۹-۱	استخراج DNA ژنومیک	۸۲
۳-۹-۲	استخراج پلاسمید	۸۴
۳-۹-۳	انجام PCR	۸۴
۳-۹-۴	PCR ژن های مورد مطالعه	۸۴
۳-۱۰	الکتروفورز محصولات PCR	۸۷
۳-۱۱	تعیین توالی	۹۱
۳-۱۲	روش جمع آوری و تجزیه و تحلیل داده ها	۹۱
	بخش چهارم: یافته ها	۹۲
۴-۱	فراوانی ایزوله های بدست آمده از بیمارستان های مختلف	۹۳
۴-۲	فراوانی ایزوله ها از نظر جنسیت	۹۳
۴-۳	فراوانی ایزوله ها از نظر نمونه های مورد آزمایش	۹۳

۴-۴	فراوانی ایزوله های به دست آمده از بخش های مختلف بیمارستانی	۹۴
۵-۴	فراوانی ایزوله های MSSA و MRSA	۹۵
۶-۴	تعیین الگوی مقاومت دارویی چندگانه تمامی ایزوله ها	۹۶
۷-۴	نتایج روش PCR	۱۰۰
۸-۴	تعیین پروفایل مقاومت آنتی بیوتیکی در ۵۷ ایزوله دارای ایتنگرون کلاس ۱	۱۰۲
۹-۴	بررسی حضور یا عدم حضور ارتباط آماری حضور ژن با نوع حساسیت آنتی بیوتیک ها	۱۰۵
۱۰-۴	تعیین منشاء ژن ایتنگرون کلاس ۱ در ۵۷ ایزوله ایتنگرون مثبت	۱۰۶
۱۱-۴	نتیجه توالی یابی و ردیف سازی	۱۰۶
۱۰۸	بخش پنجم: بحث و نتیجه گیری	
۱-۵	بحث	۱۰۹
۲-۵	نتیجه گیری	۱۱۴
۳-۵	پیشنهادهات	۱۱۵
۱۱۶	منابع و مآخذ	
۱۳۱	ضمیمه	
i	چکیده انگلیسی	

فهرست جداول

- جدول ۱-۱ طبقه بندی علمی / استافیلوکوکوس / اورئوس ۱۰
- جدول ۲-۱ دامنه میزبان گونه و زیر گونه های استافیلوکوکوس ۱۲
- جدول ۳-۱ سوپرآنتی ژن های / استافیلوکوکوس / اورئوس، ناحیه اتصال به $V\beta$ و جایگاه ژنی ۳۱
- جدول ۴-۱ تنوع عملکرد و مکانیسم های مقاومت آنتی بیوتیک های رایج مورد استفاده ۴۰
- جدول ۵-۱ کاست های ژنی ایتگرون مسئول کد کننده ی شاخص های مقاومت آنتی بیوتیک ۶۰
- جدول ۱-۳ جدول متغیرهای مطالعه ۷۳
- جدول ۲-۳ آنتی بیوتیک های مورد استفاده در روش دیسک دیفیوژن ۸۱
- جدول ۳-۳ شرایط دمایی و زمانی سیکل های PCR ژن های مورد مطالعه ۹۰
- جدول ۴-۳ ۴ توالی پرایمرها و ساینز باندهای محصولات PCR ژن های مورد مطالعه ۹۰
- جدول ۱-۴ توزیع فراوانی ایزوله های / استافیلوکوکوس / اورئوس بر حسب نوع نمونه ۹۴
- جدول ۲-۴ توزیع فراوانی ایزوله های / استافیلوکوکوس / اورئوس بر حسب بخش بیمارستانی ۹۵
- جدول ۳-۴ توزیع فراوانی الگوی مقاومت چندگانه در ایزوله های / استافیلوکوکوس / اورئوس ۹۶
- جدول ۴-۴ بررسی الگوهای حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های / استافیلوکوکوس / اورئوس MDR و Non-MDR ۹۷
- جدول ۵-۴ تعیین مشخصات ایزوله های دارای ایتگرون کلاس ۱ بر حسب: نوع، بخش نمونه، بیمارستان، پروفایل مقاومت آنتی بیوتیکی و منبع قرارگیری ژن *IntI1* ۱۰۲

جدول ۶-۴ فراوانی ژن *IntI 1* در بین ایزوله های مقاوم به متی سیلین و دارای مقاومت دارویی

چندگانه ۱۰۴

جدول ۷-۴ پروفایل حساسیت آنتی بیوتیکی برای تمام ایزوله ها، ایزوله های ایتگرون مثبت و ایتگرون

منفی و بررسی *P value* در بین ایزوله های ایتگرون مثبت و منفی ۱۰۵

فهرست اشکال

شکل ۱-۱ نمایی از آرایش /ستافیلوکوکوس/اورئوس ۱۰

شکل ۲-۱ تخمیر قند مانیتول بر روی محیط کشت MSA ۱۸

شکل ۳-۱ ساختار پتیدوگلیکان در /ستافیلوکوکوس/اورئوس ۲۴

شکل ۴-۱ اتصال پروتئین A به ایمنوگلوبین ها ۲۵

شکل ۵-۱ کودک دو ساله درگیر شده با بیماری SSSS ۳۳

شکل ۶-۱ نوع فعالیت برخی از آنتی بیوتیک های عمده ۴۰

شکل ۷-۱ بیوسنتز پتیدوگلیکان و مکانیسم عملکرد ونکومایسین ۴۳

شکل ۸-۱ ساختار ایتگرون کلاس ۱ ۵۴

شکل ۹-۱ ساختار یک المنت ۵۹ جفت باز ۵۵

شکل ۱۰-۱ مکانیسم ایتگرون کلاس ۱ مرتبط با برش و جایگزینی آن ۵۹

شکل ۱-۳ واکنش کاتالاز ۷۶

شکل ۲-۳ کواکولاز اسلایدی بر روی لام میکروسکوپی ۷۶

شکل ۳-۳ تست کوآگولاز لوله ای	۷۷
شکل ۳-۴ تست Dnase	۷۷
شکل ۳-۵ تست مانیتول سالت آگار روی پلیت	۷۸
شکل ۳-۶ روش دیسک دیفیوژن با دیسک های اگزاسیلین و سفوکسیتین	۸۱
شکل ۳-۷ اندازه گیری غلظت DNA استخراجی توسط دستگاه نانو دراپ	۸۴
شکل ۳-۸ دستگاه ترموسایکلر و چیدمان نمونه ها در داخل آن	۸۶
شکل ۳-۹ دستگاه الکتروفورز	۸۹
شکل ۴-۱ ژل الکتروفورز ژن femA	۱۰۰
شکل ۴-۲ ژل الکتروفورز ژن IntI1	۱۰۱
شکل ۴-۳ ژل الکتروفورز IntI2 و IntI3	۱۰۱
شکل ۴-۴ ردیف سازی یک نمونه ژن IntI1 مثبت	۱۰۶

فهرست نمودارها

نمودار ۴-۱ فراوانی ایزوله های MRSA و MSSA	۹۶
نمودار ۴-۲ توزیع فراوانی ایزوله های MDR بر حسب نوع نمونه	۹۹
نمودار ۴-۳ توزیع فراوانی ایزوله های MDR بر حسب بخش بیمارستانی	۹۹
نمودار ۴-۴ فراوانی ایزوله های MRSA و MSSA در بین ۵۷ ایزوله ژن IntI1 مثبت	۱۰۴
نمودار ۴-۵ فراوانی منشاء پلازمید در بین ۵۷ ایزوله حامل ایتنگرون کلاس ۱	۱۰۶

چکیده

زمینه و هدف: استافیلوکوکوس اورئوس به ویژه استافیلوکوکوس اورئوس سویه های مقاوم به متی سیلین (MRSA) یکی از عوامل عمده ایجاد عفونت های بیمارستانی و کسب شده از جامعه، که دارای میزان موربیدیتی و مورتالیتی بالایی در دنیا می باشند. نقش اینتگرون ها در گسترش ژن های مقاوم آنتی بیوتیک بین باکتری گرم مثبت مانند استافیلوکوکوس اورئوس در مقایسه با باکتری های گرم منفی کاملاً مشخص و واضح نمی باشند. اهداف ما از این مطالعه تعیین ایزوله های MRSA و MDR و یافتن اینتگرون های کلاس ۱، ۲ و ۳ بین ایزوله های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس بود.

مواد و روش ها: ۲۳۰ ایزوله بالینی تکرار نشده استافیلوکوکوس اورئوس از بیماران بستری در بیمارستان های آموزشی شهر تهران و قزوین جمع آوری شدند. حساسیت آنتی بیوتیکی استافیلوکوکوس اورئوس ها به ۱۶ آنتی بیوتیک مختلف از طریق روش دیسک دیفیوژن بر اساس جدول CLSI مورد بررسی واقع شد. استخراج ژنومیکی و پلاسمیدی تمامی ایزوله ها به وسیله ۲ کیت استخراج (بایونیر- ساخت کره) جداگانه انجام پذیرفت و در ادامه آزمون PCR برای یافتن ژن های اینتگرون کلاس ۱، ۲ و ۳ انجام شد.

یافته ها: از مجموع ۲۳۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس، ۱۳۶ (۵۹/۱٪) ایزوله MRSA و ۱۴۱ (۶۱/۳٪) ایزوله دارای الگوی مقاومت دارویی چندگانه بودند. PCR و توالی یابی نشان داد که اینتگرون کلاس ۱ تنها در ۵۷ (۲۴/۸٪) ایزوله وجود داشت. در بین این ایزوله ها ۳۲ (۵۶/۱٪) MRSA و ۳۳ (۵۷/۹٪) MDR بودند. کلاس ۲ و ۳ اینتگرون در هیچ یک از ۲۳۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس یافت نشد. در آنالیز بین حضور اینتگرون کلاس ۱ و تست های فنوتیپی مقاومت آنتی بیوتیکی هیچ گونه ارتباط معناداری یافت نشد ($P \text{ value} > 0.05$).

نتیجه گیری: ژن *IntI1* تقریباً در یک چهارم ایزوله های این مطالعه وجود داشت. میزان شیوع بالای ایزوله های MRSA و MDR و همچنین حضور همزمانی اینتگرون کلاس ۱ در بین چنین ایزوله هایی باید یک نگرانی مهم در جامعه پزشکی در نظر گرفته شود.

واژگان کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، مقاومت چندگانه، اینتگرون ها، MRSA



بخش اول

مقدمه

۱-۱ بیان مسئله

استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یکی از مهم ترین عوامل عفونت های بیمارستانی و همچنین پاتوژن های مهم اکتسابی از اجتماع می باشد (۱). *استافیلوکوکوس اورئوس* مسئول بیماری هایی از جمله سندرم شوک سمی، سندرم فلسی شدن پوست، عفونت های دستگاه ادراری، باکتری می و سندرم شوک سپتیک می باشد.

مقاومت آنتی بیوتیکی در بین سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* بسیار شایع است و این به سبب کسب فاکتورهای مقاومت متعدد می باشد. بدین صورت که با ورود هر آنتی بیوتیک جدید، سویه های مقاوم باکتری به سرعت ظهور یافته اند و درمان عفونت های حاصل از این باکتری را با دشواری مواجه کرده اند (۲ و ۳). یکی از مشکلات عمده در درمان و پیش گیری از عفونت های *استافیلوکوکوس اورئوس*، مقاومت این باکتری نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف از قبیل بتالاکتام ها، آمینوگلیکوزیدها، ماکرولیدها و غیره می باشد این امر موجب گسترش عفونت های ناشی از این باکتری و هم چنین بروز مشکلاتی از قبیل افزایش مرگ و میر، افزایش میزان جراحات وارده به بیماران بستری شده، افزایش مدت زمان بستری بیماران در بیمارستان ها و افزایش هزینه های بیمه های درمانی گردیده که این مسئله پزشکان را جهت درمان عفونت های ناشی *استافیلوکوکوس اورئوس* با محدودیت های بسیاری مواجه کرده است (۴).

این باکتری از طریق مکانیسم های مختلفی نسبت به داروهای ضد میکروبی مقاوم می شود: از جمله آنزیم های تخریب کننده دارو ها مثل پنی سیلیناز در مقابل داروهای بتالاکتام، کاهش تمایل و افینیتی داروها برای اتصال به جایگاه های هدف، مثل مقاومت به پنی سیلین های مقاوم به بتالاکتامها به دلیل حضور ژن *mec A*، موتاسیون در زیرواحدهای ساختاری اهداف اتصال داروها مثل مقاومت به کینولون ها و دیگر مکانیسم ها مانند پمپ افلاکس (۵).

منشا این مقاومت ها معمولاً کروموزومی، و یا توسط عناصر ژنتیکی سیار مانند پلاسمیدها، ترانسپوزون ها و ایتگرون ها می باشد (۵). ایتگرون ها یک واحد ژنتیکی برای دریافت و بیان ژن هستند که در کروموزوم، پلاسمید و یا ترانسپوزون باکتری جای دارند. نقش ایتگرون ها به عنوان یک مکانیسم ژنتیکی سیار از طریق انتقال افقی در مقاومت آنتی بیوتیکی به خوبی محرز شده است. انتقال ژن های مقاومت به آنتی بیوتیک ها در ایتگرون ها از طریق فرآیند هایی مثل ترانسفرمایسون، ترانسداکشن و هم یوگی در بین سویه های مختلف یا جنس های مختلف باکتریایی وجود دارد (۶ و ۷).

در مجموع، ایتگرون ها کاست های ژنی مشخصی را می پذیرند که معمولاً حاوی یک یا چند ژن (اغلب ژن های مقاومت دارویی) به همراه یک جایگاه محافظت شده می باشند که مقدمات جای گیری آن ها را در این عناصر فراهم کنند (۸). تاکنون بیش از ۶۰ کاست ژنی متفاوت در مجموعه ایتگرونی شناسایی شده اند که باعث مقاومت به آنتی بیوتیک های مهمی می شوند از جمله: آمینوگلیکوزیدها، پنی سیلین ها ، سفالوسپورین ها ، کارباپنم ها، تریمتوپریم، کلرامفنیکل، ریفاپیمین، اریترومایسین و ترکیب های چهار گانه آمونیومی. برخی از مطالعات ایتگرون های حاوی بیش از یک کاست ژنی را گزارش کرده اند که ایزوله های باکتری های حاوی آن ها را مستعد داشتن الگوی مقاومت دارویی چندگانه می کند. در بین کلاس های ایتگرونی شناخته شده، ایتگرون کلاس یک از اهمیت بالایی در انتقال ژن های مقاومت دارویی برخوردار است (۹).

یک ایتگرون کامل عملکردی شامل سه عنصر اصلی می باشد : ژن ایتگراز (*intI*) کد کننده ی آنزیم ایتگراز است، جایگاه اولیه نو ترکیبی مجاور (*attI*) و یک ژن پروموتور (*Pc*) که این سه جایگاه در تمام ایتگرون ها مشترک می باشد (۶). بر اساس همولوژی پروتئین های ایتگراز، ایتگرون ها درون ده کلاس مختلف طبقه بندی می شوند. پنج کلاس از این ها سبب مقاومت آنتی بیوتیکی می شوند. ایتگرون کلاس I اینطور به نظر می رسد

که بیشترین شیوع در بین باکتری های گرم مثبت و منفی کلینیکی را دارا می باشد (۷).

اینتگرون کلاس I با خانواده ترانسپوزنی از نوع Tn3 مرتبط می باشد، حضور این اینتگرون در دسته ی وسیعی از باکتری های گرم منفی کلینیکی از جمله اسیتوباکتر، ائروموناس، آکالیژنز، بورخولدیریا، کمپیلوباکتر، انتروباکتر، اشرشیا، کلبسیلا، مایکوباکتریوم، سودوموناس، سالمونلا، ویبریو، شیگلا و همچنین در تعداد کمی از باکتری های گرم مثبت گزارش شده است (۶).

اینتگرون کلاس II نیز به عنوان یکی از عوامل انتقال ژن های مقاومت در باکتری ها در نظر گرفته می شود و به طور معمول در برخی از گونه های باکتری های گرم منفی از جمله اسیتوباکتر، انتروباکتریاسه، سالمونلا و سودوموناس دیده شده است. این کلاس از اینتگرون با خانواده ترانسپوزنی Tn7 در ارتباط می باشد (۶).

اینتگرون کلاس III دارای ساختار قابل قیاس با دیگر کلاس های اینتگرونی است و در برخی از باکتری ها از جمله سودوموناس آلکالیزنز، سراسیا مارسس سنز و کلبسیلا پنوموفیلا دیده شده است (۶).

از زمانی که اینتگرون کلاس ۱ به عنوان یکی از اولین منابع ژن های مقاومت ضد میکروبی شناخته شد و به عنوان یکی از مخازن و عوامل تعویض کننده ژن های مقاومت درون جمعیت های میکروبی مورد ظن واقع شد، نقش آن در پخش و انتشار ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی در یک گروه متنوع از باکتری های گرم منفی به خوبی بررسی شده است و با یک توزیع وسیعی حدود ۵۹-۲۲٪ بین ارگانسیم های گرم منفی به ثبت رسیده است (۶).

با این وجود شناخت کمی درباره شیوع اینتگرون کلاس ۱ در باکتری های گرم مثبت وجود دارد. در سال ۱۹۹۸ یک نمونه کلاس اینتگرونی مرتبط با شاخص مقاومت به استرپتومایسین / اسپیکتینومایسین روی یک پلاسمید - ۲۹kb به نام pCG4 از کورینه باکتریوم گلوتامیکوم، شناسایی شد که حتی توانایی بیان بالاتری در مقایسه با

اینتگرون یافت شده در اشرشیا کلی از خود نشان داد. در سال ۲۰۰۲ یک ژن مانند *intII* همراه با یک کاست ژن جدید آمینوگلیکوزید آدنیل ترانسفراز *addA9* روی یک پلاسمید R با طول 27.8-kb به نام pTET3 از کورینه باکتریوم گلوتامیکوم مشاهده شد که ژن مقاومت به استرپتومایسین، اسپیکتینومایسین و تتراسیکین را کد می کند (۶).

در سال ۱۹۹۹ اولین مشاهده اینتگرون کلاس ۱ مرتبط با ژن *aadA* در انتروکوک فکاليس W4470 یافت شد. و همچنین اولین گزارش حضور اینتگرون کلاس ۲ در انتروکوک فکاليس و اینتگرون کلاس ۱ در انتروکوک فاسیوم در مطالعات بعدی به ثبت رسید، که اولین مدرک حضور اینتگرون کلاس ۲ در بیرون از ارگانسیم های گرم منفی بوده است (۶). با این وجود توضیح و اثبات ارتباط بین اینتگرون های ژنتیک و مقاومت آنتی بیوتیکی نیازمند مطالعات در مقیاس بزرگتر بخصوص در باکتری های گرم مثبت می باشد (۶). در سال های اخیر، اگرچه اینتگرون ها در باکتری های گرم مثبت پیدا شده اند، اما نقش اینتگرون در مقاومت باکتری /استافیلوکوکوس اورئوس نامشخص باقی مانده است (۶).

از آنجایی که سویه هایی با مقاومت چندگانه در استافیلوکوک ها از شیوع بالایی برخوردار است لذا بررسی مکانیزم های مقاومت و انتشار آن از جمله اینتگرون ها حائز اهمیت زیادی می باشد. از آنجایی که اکثر مطالعات بر روی اینتگرون ها در باکتری های گرم منفی انجام شده و مطالعات بسیار کمی بر روی باکتری های گرم مثبت انجام شده ، لذا در این مطالعه بر آن شدیم ضمن بررسی الگوی مقاومت دارویی و تعیین سویه های MDR در ایزوله های /استافیلوکوکوس/ اورئوس به عنوان یک پاتوژن مهم و بسیار مقاوم به بررسی فراوانی اینتگرون های کلاس ۱، ۲ و ۳ جدا شده از نمونه های بالینی بیماران بستری در بیمارستان های قزوین و تهران بپردازیم.

Rosenbach اولین توصیف جدی خود از استافیلوکوکوس را مطرح کرد و این جنس را به دو گونه استافیلوکوکوس اورئوس^۱ و استافیلوکوکوس آلبوس^۲ تقسیم نمود. Passet یک گونه سوم را به نام استافیلوکوکوس سیتروئوس^۳ اضافه نمود. مورفولوژی (ریخت شناسی) و نوع تجمع سلولی معیاری برای طبقه بندی جنس، و رنگ کلنی معیاری برای طبقه بندی گونه، مورد استفاده قرار گرفت. Zopf استافیلوکوک ها و یک گروهی از میکروکوکسی های با ظاهر چهارتایی ساپروفیتیک، را درون جنسی به نام میکروکوکوس بازگرداند و Flugge کوکسی ها را دوباره مورد بازآرایی قرار داد و جنس استافیلوکوکوس را از جنس میکروکوکوس جدا نمود. او این دو جنس را ابتدا بر اساس فعالیتشان بر روی ژلاتین و ارتباط همزیستی آنها با میزبان های خود از هم تمایز داد. Evan و همکاران در سال ۱۹۹۵ پیشنهاد جداکردن استافیلوکوک ها از میکروکوک ها بر اساس نحوه مصرف اکسیژن به منظور تخمیر گلوکز با تست استاندارد اکسیداسیون - تخمیر (OF) مطرح نمود. کوکسی های بی هوازی اختیاری در جنس استافیلوکوکوس، و بی هوازی اجباری در جنس میکروکوکوس قرار داده شدند. جدایی این جنس ها بر اساس تست OF تا زمانی ادامه یافت که مشخص شد این دسته بندی کامل نمی باشد. تحقیقات گسترده تر بر روی کوکسی های کاتالاز +، گرم مثبت نشان داد که استافیلوکوک ها مقدار G + C اسید نوکلئیک آنها ۳۰-۳۹٪ می باشد در حالی که میکروکوک ها مقدار G + C آنها ۶۳-۷۳٪ می باشد. اگرچه هر دو جنس در خانواده میکروکوکاسه قرار دارد، واگرایی گسترده در ترکیبات بازهای DNA آنها نشان می دهد که به طور چشمگیری به هم مرتبط نیستند. بیشتر مطالعات سیستماتیک اخیر، استافیلوکوک ها را

^۱ *Staphylococcus aureus*

^۲ *Staphylococcus albus*

^۳ *Staphylococcus citreus*

از میکروکوک ها و دیگر باکتری ها را بر اساس ترکیبات دیواره سلول، سیتوکروم، مناکوئینها، اسیدهای چرب سلولی، لیپیدهای قطبی، هیبریدازاسیون DNA-rRNA و تفاوت در قسمت 16S rRNA تشخیص داده است. در حال حاضر شناسایی شده که جنس استافیلوکوکوس ها به باسیلوس و استرپتوکوکوس نزدیک ترند و به دسته ی بزرگ باسیلوس - لاکتوباسیلوس - استرپتوکوکوس که شامل باکتری های گرم مثبت با محتوای G + C کم، تعلق دارند. این ارگانیزم ها در حال حاضر به طور موقتی همراه با استافیلوکوک ها در خانواده باسیلاسه[‡] و راسته باسیلالس[°] قرار داده شده اند (۱۰).

۳-۱ ویژگی های جنس استافیلوکوک

استافیلوکوک ها باکتری های گرم مثبت، با قطر ۰/۵ - ۱/۵ میکرومتر هستند که توسط کوکسی های منفرد که در بیش از یک سطح برای تشکیل دسته های (خوشه های) انگور مانند تقسیم می شوند، و توسط این ویژگی‌شان شناخته می شوند. امروزه ۳۲ گونه و ۸ زیرگونه در جنس استافیلوکوکوس وجود دارند که بیشتر آنها ترجیحاً روی بدن انسان کلنیزه می شوند، اما /استافیلوکوکوس/ اورئوس و /استافیلوکوکوس/ پیدرمیتیس دو سویه ای هستند که بیشترین شناخت و مطالعه بر روی آنها صورت گرفته است (۱۱).

استافیلوکوک ها غیرمتحرک، غیر اسپورزا و بی هوازی های اختیاری هستند که از طریق تنفس هوازی یا از طریق تخمیر رشد می کنند. اکثر گونه ها دارای یک نیاز غذایی نسبتاً پیچیده می باشند، اما در کل آنها نیازمند یک منبع آلی از نیتروژن، که توسط ۵ تا ۱۲ اسید آمینه مانند آرژنین، والین، و ویتامین های B شامل تیامین و نیکوتینامید تامین می شود. اعضای این جنس کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی می باشند. استافیلوکوکسی ها در برابر غلظت

[‡] Bacillaceae

[°] Bacillales

های بالای نمک و گرما از خود مقاومت نشان می دهند (۱۲).

استافیلوکوک های بیماریزا دارای شاخص های منحصر به فردی در مقایسه با انواع گونه های غیر بیماریزا می باشند. این شاخص ها شامل آنزیم کوآگولاز، فاکتور تجمع کننده و پروتئین متصل شونده به فیبرینوژن است که سبب مثبت شدن تست کوآگولاز می شود. این تست ارزش تشخیصی در آزمایشگاه داشته و به افتراق سریع میان استافیلوکوک های کوآگولاز مثبت (مانند *استافیلوکوکوس اورئوس*) و کوآگولاز منفی کمک می نماید (۱۲).

۱-۴ طبقه بندی

در سال ۱۹۸۶ کتاب برجی خانواده میکروکوکاسیه را در چهار جنس پلانوکوکوس، میکروکوکوس، استوماتوکوکوس و استافیلوکوکوس قرار داده بود. پس از انجام مطالعات مولکولی بر اساس 16s rRNA مشاهده گردید که این چهار جنس نمی توانند در یک خانواده مشترک قرار بگیرند. در نسخه ی جدید کتاب برجی استافیلوکوکوس در شاخه فرمی کوتس و خانواده استافیلوکوکاسیه قرار گرفت (۱۲). طبقه بندی *استافیلوکوکوس اورئوس* در جدول (۱-۱) عنوان شده است.

جنس استافیلوکوکوس دارای ۳۲ گونه است که ۱۶ گونه ی آن در انسان یافت می شود. تنها چند گونه از آن ها در شرایط مستعد میزبان مانند سرکوب ایمنی یا حضور جسم خارجی، بیماریزا می باشند. انواع بسیار بیماریزا آنها، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس لوگدونسیس*^۶ در انسان و *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس ایترومدیوس*^۷ در حیوانات هستند (۱۳). اگرچه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* به طور شایع مسئول عفونت هایی به واسطه تجهیزات پزشکی و عفونت های ادراری می باشند،

^۶ *Staphylococcus lugdunensis*

^۷ *Staphylococcus intermedius*

اما بیماری های خفیف تری نسبت به /استافیلوکوکوس اورئوس ایجاد می نمایند (۱۴).

جدول ۱-۱ طبقه بندی علمی /استافیلوکوکوس اورئوس

<i>Staphylococcus aureus</i>	
Scientific classification	
Domain	Bacteria
Kingdom	Eubacteria
Phylum	Firmicutes
Class	Bacilli
Order	Bacilalles
Family	Staphylococcaceae
Genus	<i>Staphylococcus</i>
Species	<i>aureus</i>



شکل ۱-۱ نمایی از آرایش /استافیلوکوکوس

اورئوس

۱-۵ دامنه میزبان

بسیاری از گونه ها و زیرگونه های استافیلوکوکی بر روی پستانداران دامنه میزبانی مختص به خود را نشان می دهند (جدول ۱-۲) دامنه میزبانی ممکن است کم و یا گسترده باشد که این امر وابسته به گونه ها یا زیرگونه های خاص می باشد. استافیلوکوک هایی که دارای میزبان انسانی هستند شامل: /استافیلوکوکوس اپیدرمیتیس،

استافیلوکوکوس کاپیتیس، استافیلوکوکوس کاپرائه، استافیلوکوکوس لوگدونسیس، استافیلوکوکوس اوریکولاریس، استافیلوکوکوس وارنری، استافیلوکوکوس ساکارولیتیکوس، استافیلوکوکوس هومونیس، استافیلوکوکوس کوهنی می باشد (۱۰).

۶-۱ جایگاه میکروارگانیزم

استافیلوکوک ها یکی از گروه های عمده باکتریایی هستند که بر روی پوست، غده های پوستی و غشاهای مخاطی مستقر هستند. رایج ترین گونه های استافیلوکوکی مستقر بر روی پوست بر حسب اندازه جمعیت، استافیلوکوکوس اپیدرمیتیس است (۱۰). استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیتیس تقریباً بر روی همه قسمت های بدن یافت می شوند. برخی دیگر از گونه ها برای قسمت های بدن اختصاصی تر عمل می کنند و فقط در آن نواحی قرار می گیرند مانند استافیلوکوکوس اوریکولاریس که بیشتر در مجرای گوش قرار دارند. در کل بیشترین تراکم استافیلوکوک ها در غدد عرق و روی غشاهای مخاطی که در برگیرنده روزنه های بدن است یافت می شوند (۱۵). بیشتر گزارشات از کلینیزاسیون استافیلوکوکی، حاکی از استافیلوکوکوس اورئوس می باشد که به عنوان یک موضوع دارای اهمیت که عامل ایجاد عفونت در انسان مطرح می باشد. بینی انسان یکی از با اهمیت ترین جایگاه کلینیزاسیون استافیلوکوکوس اورئوس می باشد، اما این باکتری همچنین در فارنکس، پرینوم و زیر بغل و روی پوست (غالباً بر روی دست ها، سینه و شکم) یافت می شود. کلینیزاسیون دایمی با استافیلوکوکوس اورئوس تقریباً در ۲۰٪ از جمعیت یافت می شود، در حالی که ۳۰٪ از استافیلوکوکوس اورئوس به صورت گذرا و تقریباً ۵۰٪ از آنها بدون حامل هستند. میزان حاملین دایمی این باکتری ها در بچه ها نسبتاً از بزرگسالان بیشتر هستند (۱۵).

جدول ۱-۲ دامنه میزبان گونه و زیر گونه های استافیلوکوکوس (۱۰)

Species and subspecies*	Natural host	Temporary (recent) host
<i>S. epidermidis</i>	Humans	
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	Humans	
<i>S. capitis</i> subsp. <i>ureolyticus</i>	Primates	
<i>S. caprae</i> subsp. 1	Humans	
<i>S. caprae</i> subsp. 2		Domestic goats
<i>S. saccharolyticus</i>	Humans	
<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	Humans	
<i>S. hominis</i> subsp. <i>novobioceticus</i>	Humans	
<i>S. haemolyticus</i> subsp. 1	Humans	Domestic artiodactyls and horses
<i>S. haemolyticus</i> subsp. 2	Primates	
<i>S. warneri</i>	Humans	Domestic artiodactyls and horses
<i>S. pasteurii</i>	Primates	Domestic artiodactyls and horses
<i>S. lugdunensis</i>	Humans	
<i>S. auricularis</i> subsp. 1	Humans	
<i>S. auricularis</i> subsp. 2	Primates	
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (A)	Primates	Domestic artiodactyls, poultry
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (B)		Domestic pigs, poultry
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (C)		Domestic artiodactyls
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (D)		Lagomorpha, Rodentia
<i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i>		Domestic sheep
<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	Primates, Scandentia	Rodentia
<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i>	Domestic cattle	
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	Humans	
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticum</i>	Primates, Scandentia	
<i>S. cohnii</i> subsp. 3	New-world monkeys	
<i>S. xylosus</i>	Rodentia	Mammals and birds
<i>S. kloosii</i>	Rodentia	Domestic artiodactyls
<i>S. equorum</i> subsp. <i>equorum</i>		Domestic horses and cattle
<i>S. arlettae</i>		Poultry
<i>S. gallinarum</i>		Poultry
<i>S. simulans</i>	Camivora	Domestic artiodactyla, humans
<i>S. camosus</i> subsp. <i>camosus</i>		Domestic artiodactyla
<i>S. felis</i>	Camivora	
<i>S. lutrae</i>	Camivora (otters)	
<i>S. intermedius</i>	Camivora	Domestic horses, poultry
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	Camivora	Humans
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	Camivora	
<i>S. delphini</i>	Cetacea	
<i>S. hyicus</i> subsp. 1	Artiodactyla (Suidae)	
<i>S. hyicus</i> subsp. 2	Artiodactyla (Bovidae)	Poultry
<i>S. chromogenes</i>	Artiodactyla, Perissodactyla	
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i>	Rodentia, Artiodactyla, Perissodactyla, Cetacea, Marsupialia	Poultry
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>rodentium</i>	Rodentia, Cetacea	
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>carnaticus</i>	Artiodactyla, Cetacea	
<i>S. lentus</i>	Artiodactyla, Perissodactyla, Cetacea	
<i>S. vitulinus</i>	Artiodactyla, Perissodactyla, Cetacea	

۷-۱ متابولیسم، ویژگی های کشت و رشد

استافیلوکوک ها هوازی یا بی هوازی اختیاری هستند، به جزء استافیلوکوکوس ساکرولیتییکوس که یک بی هوازی اجباری می باشد. کلنی های تولید شده بر روی محیط تلقیح شده، بعد از گذشت ۱۸ تا ۲۴ ساعت از انکوباسیون

دارای اندازه ۴ تا ۸ میلی متر و به رنگ سفید یا به ندرت طلایی روشن و ظاهر کره ای مانند دارند. به ندرت سویه هایی از استافیلوکوک ها سخت رشد وجود دارند که نیازمند CO_2 ، همین یا ویتامین می باشند (۱۶).

استافیلوکوک ها به خوبی در محیط های متنوع مایع تجاری که شامل، تریپتیک سوی برات، مایع اینفیوژن قلب - مغز، نوترینت برات و تربیتوز فسفات برات به اضافه خون یا بدون خون رشد می کنند. استافیلوکوک ها کاتالاز تولید می کنند، تست کاتالاز آنها را از استرپتوکوک ها متمایز می سازد. /استافیلوکوکوس/ و /ورئوس/ دارای خصوصیات بیوشیمیایی و متابولیسمی گسترده ای می باشد که در ادامه به آن پرداخته شده است (۱۴).

گلوکز و دیگر قند های کاهشی در میزان بسیار اندکی در عرق و سطح پوست انسان وجود دارد و احتمالاً یک منبع بزرگ کربن خارجی برای استافیلوکوک های در حال رشد در زیستگاه اولیه آن ها است. در برخی از بافت ها میزان بالاتری از گلوکز حضور دارد (مثل خون کبد، کلیه ها، عضله) و ممکن است در دسترس استافیلوکوک های مهاجم باشند. لاکتیک اسید و لاکتات مهمترین منبع کربن برای استافیلوکوک ها می باشند که می توانند به آسانی و به صورت برگشت پذیر آن ها را به محصولات پایانی مانند پیرویک اسید تبدیل کنند و در نتیجه اجازه آنها برای ورود به مسیرهای متابولیسم پیروات و جذب آن را فراهم نمایند. این ترکیبات عموماً از گلیکولیز در بافت های میزبان و شکستن گلیکوژن در غدد عرق مشتق می شود. استافیلوکوک ها قادر به استفاده از انواع کربوهیدرات به عنوان منبع کربن و انرژی می باشند. کربوهیدرات می توانند پس از دریافت در درون سلول تجمع پیدا کنند که این عمل می تواند بدون تغییر در شکل قند یا در هنگام دریافت همراه با تغییرات کوالانسی باشد. در نوع دوم دریافت قند، قند در طی فرآیند انتقال فسفریله می شود که این عمل به وسیله فسفوانول پیروات (PEP) سیستم فسفو ترانسفراز (PTS) میانجی گیری می شود. گلوکز، مانوز، گلوکزآمین، فروکتوز، لاکتوز، گالاکتوز، مانیتول، N استیل گلوکزآمین و β گلوکوزید از طریق سیستم PTS دریافت می شوند. لاکتوز

مخصوص PTS/استافیلوکوکوس/اورئوس از چهار آنزیم، آنزیم I (EI)، Hpr، آنزیم III (EIII) و آنزیم II (EII) که به ظاهر یک کمپلکس چند آنزیمی متصل به غشاء را تشکیل می دهد. برخی از قندها از جمله پنتوز ریبوز، زایلوز و آرابینوز از مسیر PTS دریافت نمی شوند. مسیر امبدن - مایر هوف - پارنز (EMP) (گلیکولیتیک) و مسیر هگزوز منوفسفات اکسیداتیو (HMP) دو مسیر مرکزی هستند که توسط استافیلوکوکوس/اورئوس برای متابولیسم گلوکز مورد استفاده می گیرد (۱۰ و ۱۴).

استافیلوکوک های بیماریزا دارای شاخص های منحصر به فردی در مقایسه با انواع گونه های غیر بیماریزا می باشد. این شاخص ها شامل آنزیم کواگولاز، فاکتور تجمع کننده و پروتئین متصل شونده به فیبرینوژن است که سبب مثبت شدن تست کواگولاز می شود. این تست ارزش تشخیصی در آزمایشگاه داشته و به افتراق سریع میان استافیلوکوک های کواگولاز مثبت (مانند استافیلوکوکوس/اورئوس، استافیلوکوکوس/اینترمدیوس، استافیلوکوکوس دلفینی، استافیلوکوکوس شلیفری، استافیلوکوکوس هیکوس) و کواگولاز منفی (استافیلوکوکوس/پیدرمدیس) کمک می نماید. استافیلوکوکوس/اورئوس به راحتی روی اکثر محیط های کشت به ویژه بلاد آگار با خون گوسفند رشد می کند. از محیط های انتخابی مانند مانتیول سالت آگار، کلمبیا کلستین نالیدیسیک اسید آگار و فنیل اتیل الکل آگار جهت جداسازی باکتری از نمونه های خلط با فلور نرمال استفاده می شود. اعضای جنس استافیلوکوکوس، گرم مثبت هستند که در گسترش های تهیه شده از چرک، کوکسی های بیشتر به صورت خوشه ای و تا حد کمتری به صورت منفرد، جفت و یا زنجیره های کوتاه نمایان می گردند. آنها غیرمتحرک، غیر اسپورزا و کاتالاز مثبت (افتراق با استرپتوکوک) می باشند (۱۷).

۸-۱ روش های شناسایی

۱-۸-۱ روش های فنوتیپی

کلاً روش های فنوتیپی بر پایه روش های می باشد که خصوصیات ظاهری و ویژگی های بیوشیمیایی باکتری را در بر می گیرد. این روش ها را می توان جهت شناسایی میکروارگانیسم بکار برد. چند تست آزمایشگاهی مهم و معمول را در ادامه تشریح خواهیم کرد :

• تست کاتالاز

آنزیم کاتالاز آزاد شدن آب و اکسیژن را از ترکیب هیدروژن پراکسید کاتالیز می کند ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{catalase} \Rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$). تولید سریع حباب ها (گاز) در زمانی که باکتری با محلول H_2O_2 مخلوط شود به عنوان تست مثبت تفسیر می شود. عدم تشکیل حباب یا ضعیف بودن آن به عنوان تست منفی تفسیر می شود. اگر هنگام برداشت کلنی از پلیت بلاد آگار دارای خون گوسفندی سهواً نمونه با سلول های قرمز خونی محیط کشت آلوده شود، باعث خطا در نتیجه آزمون کاتالاز می شود زیرا باعث تشکیل حباب های ضعیفی می شود، لذا نباید این تست را مثبت تفسیر کرد. به علت اینکه تست کاتالاز کلید شناسایی بسیاری از ارگانیسم های گرم مثبت می باشد، تفسیر آن باید به دقت انجام بگیرد. برای مثال استافیلوکوک ها کاتالاز مثبت هستند در حالی که استرپتوکوک ها و انتروکوک ها کاتالاز منفی هستند. به طور مشابه نیز واکنش کاتالاز لیستریا مونوسایتوژنز و کورینه باکتری ها (کاتالاز مثبت) را از دیگر باکتری های باسیل گرم مثبت، غیر اسپورزا تمایز می دهد (۱۸).

• تست کواگولاز

این تست برای تمیز دادن *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوک* های کواگولاز مثبت از *استافیلوکوک* های کواگولاز منفی مورد استفاده قرار می گیرد. *استافیلوکوکوس اورئوس* دو شکل از کواگولاز، که عبارتند از متصل شده و آزاد را تولید می کند. کواگولاز متصل شده یا فاکتور تجمعی به دیواره سلولی باکتری متصل شده است و به صورت مستقیم با فیبرینوژن واکنش می دهد که نتیجه آن رسوب فیبرینوژن بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* است که سبب تجمع سلول ها در زمانی که سوسپانسیون باکتری با پلاسمای خون مخلوط شود. این نوع کواگولاز به راحتی توسط تست کواگولاز اسلایدی شناسایی می شود و برای کلنی های کاتالاز مثبت که از لحاظ مورفولوژی شبیه *استافیلوکوکوس اورئوس* هستند مورد استفاده قرار می گیرند. اگر آگلوتیناسیون رخ دهد ایزوله را می توان *استافیلوکوکوس اورئوس* در نظر گرفت. با این وجود برخی از سویه ها مانند *استافیلوکوکوس لوگدنسیس* و *استافیلوکوکوس شلفری* همچنین دارای فاکتور تجمع ای می باشند (۱۶).

به دلیل اینکه ۵٪ از *استافیلوکوکوس اورئوس* فاکتور تجمع ای تولید نمی کنند، هر تست منفی کواگولاز اسلایدی باید با روش لوله ای نیز تایید شود که *استافیلوکواگولاز* یا کواگولاز آزاد را شناسایی می کنند. *استافیلوکواگولاز* یک مولکول خارج سلولی هست که باعث تشکیل یک لخته می شود. زمانی که سلول های باکتریایی با پلاسما انکوبه شوند. *استافیلوکواگولاز* با یک مولکول شبیه ترموپین مقاوم به حرارت که فاکتور واکنش دهنده با کواگولاز (CRF) نام دارد واکنش می دهد و کمپلکس کواگولاز – CRF را تشکیل می دهند. کمپلکس به صورت غیر مستقیم فیبرونوژن را به فیبرین تبدیل می کند. لخته تشکیل شده در لوله ممکن است تحت تاثیر دستخوش یک لیز خود به خودی (بخاطر فیبرولیزین) قرار بگیرد که نتیجه منفی را در پی خواهد داشت. آزمایشگاه های بالینی باید تشکیل لخته را بعد از مدت ۴ ساعت از انکوباسیون در ۳۷ درجه بررسی کنند.

اگر هیچ لخته ای ظاهر نشد لوله را باید در دمای اتاق قرار داده و در ادامه روز بررسی شود و بعد از گذشت ۲۴ ساعت نتایج منفی می بایست گزارش گردد (۱۶ و ۱۹).

• تست DNase

DNA یک پلی نوکلئوتید متشکل از واحد های منومری مونوکلوئوتیدی پورین و پیریمیدین می باشد. بیشتر DNase باکتریایی اندونوکلازهایی هستند که پیوندهای فسفودی استر داخلی را می شکنند و DNA را به زیر واحد های کوچکتر تبدیل می نمایند. DNase خارج سلولی می تواند توسط تعدادی از باکتری ها از جمله /استافیلوکوکوس/ اورئوس و /سراسیا مارسنسر/ تولید شود. محیط تست DNase معمولاً حاوی ۰/۲٪ DNA می باشد. بعد از تلقیح باکتری به صورت خط مستقیم بر روی محیط کشت، پلیت را به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه کرده و بعد از سپری شدن این زمان بر روی پلیت HCL یک نرمال بر روی محیط اضافه کرده اگر باکتری دارای این آنزیم بوده محیط در قسمتی که باکتری کشت داده شده بود به صورت منطقه شفاف نمایان می شود در غیر این صورت DNA غیر هیدرولیز شده با HCL به صورت غیر محلول باقی می ماند و تشکیل رسوب می دهد (۱۶).

• تخمیر مانیتول

مانیتول سالت آگار یک محیط انتخابی و افتراقی مقدماتی است که برای بازیابی و شناسایی استافیلوکوک ها از نمونه های دارای فلورا مفید می باشد. در این محیط غلظت نمک موجود در حدود ۷/۵٪ می باشد که از رشد بسیاری از باکتری های گرم منفی و باکتری های گرم مثبت به جزء گونه های استافیلوکوک و انتروکوک جلوگیری می کند. /استافیلوکوکوس/ اورئوس قادر به تخمیر قند مانیتول که تنها قند موجود در این محیط است و

محصولات اسیدی تولید می کند. کاهش pH محیط باعث تغییر رنگ نشانگر pH، فنل رد به رنگ زرد می شود.

کلنی های /استافیلوکوکوس/ اورئوس عموماً زرد با یک منطقه زرد رنگ محصور شده به نظر می رسند.



شکل ۱-۲. تخمیر قند مانیتول بر روی

میحط کشت MSA

• تنوع مورفولوژیکی

واریانت های کلنی کوچک[^] (SCVs) از تحت جمعیت (subpopulation) باکتری های اگزوتروفیک کند رشد تشکیل شده اند که دارای ویژگی های فنوتیپی و بیماریزایی متفاوتی می باشند. SCVs همچنین به عنوان واریانت کلنی کوتاه شناخته می شوند که اولین بار در سال ۱۹۱۰ توسط جاکوبسون در سالمونلا تیفی مطرح شد (۲۰). SCVs /استافیلوکوکوس/ اورئوس از طریق میزان رشد کم و اندازه کلنی کوچک نسبت به سویه های مادری خود مشخص می گردند و می توانند سبب عفونت های پایدار ریه بیماران سیستمیک فایبروزیس و عفونت های پوستی، استخوان و وسایل جاگذاری طبی شوند (۲۱). عفونت به وسیله SCVs /استافیلوکوکوس/ اورئوس سبب پدیدار شدن یک مشکل در تشخیص می باشد چرا که به دلیل ویژگی های فنوتیپی غیرمعمول تشخیص را

[^] Small Colony Variants

با سختی همراه کرده است (۲۲). SCVs / استافیلوکوکوس / اورئوس از نظر بالینی به دلیل کاهش حساسیت آنها نسبت به آنتی بیوتیک ها به درمان مقاوم بوده و دارای اهمیت می باشند. SCVs، برای ترکیباتی همچون همین^۹، ویتامین K یا تیمیدین اگزوتروف هستند که نتیجه آن نقص در زنجیره ی انتقال الکترون و در نهایت کاهش پتانسیل غشایی و کاهش دریافت آنتی بیوتیک های کاتیونی می باشد. مقاومت به آنتی بیوتیک های فعال دیواره سلولی باکتری مانند β -لاکتام ها ناشی از میزان رشد کند و کاهش متابولسیم دیواره سلولی SCVs می باشد (۲۱). این باکتری ها همچنین به آمینوگلیکوزیدها نیز مقاوم هستند (۲۲).

۱-۸-۲ روش های ژنوتیپی

از تکنیک های مولکولی همچون PCR یا DNA پروب جهت شناسایی / استافیلوکوکوس / اورئوس استفاده می شود. ژن های که با روش PCR مورد بررسی قرار می گیرد باید دارای توالی های حفاظت شده باشد تا در تشخیص میکروارگانیزم با مشکل مواجه نشود. بر این اساس برای شناسایی / استافیلوکوکوس / اورئوس از پرایمر های ژن های nuc (نوکلئاز مقاوم به حرارت) و ژن femA (پروتئین دیواره سلولی) استفاده می شود که دارای اختصاصیت بالا می باشد (۲۳).

۱-۹ روش های تایپینگ / استافیلوکوکوس / اورئوس

تاکنون تکنیک های مختلفی برای تیپ بندی سویه های / استافیلوکوکوس / اورئوس معرفی شده است که وسیله مناسبی برای استفاده پزشکان و اپیدمیولوژیست ها می باشد. این تکنیک ها از قدرت تفکیک، تکرار پذیری متفاوتی برخوردارند. برای سال های متمادی روش فاژ تایپینگ بهترین و اصلی ترین روش تیپ بندی محسوب می شد اما

^۹ Hemin

بعدها روش های جدیدتر و مناسب تری جایگزین این تکنیک شدند (۲۴). از جمله این روش ها ریبوتایپینگ، PFGE^{۱۰}، RFLP^{۱۱} و MLST^{۱۲}، MLEE^{۱۳} و تیپ بندی براساس پلاسمید است. پرکاربردترین تکنیک برای تیپ بندی استافیلوکوک ها در سراسر دنیا، PFGE می باشد (۲۵). اما این روش تکرار پذیری کمی داشته و مقرون به صرفه نیست. MLEE نیز برای تعیین سویه های مختلف استافیلوکوکوس/اورئوس از منابع مختلف استفاده شده است اما این روش از نظر تکنیکی دشوار می باشد (۲۶). اصول اولیه تکنیک MLST مشابه MLEE بوده اما نیاز به توالی یابی دارد و برای مطالعات اپیدمیولوژیک در سطح کوچک مناسب می باشد. روش MALDI-TOF M^{۱۴} نیز تکنیک جدیدی است که برای بررسی Finger printing سویه های استافیلوکوکوس/اورئوس و تعیین الگوی MRSA استفاده شده است (۲۷). کاربرد این تکنیک در مطالعات اپیدمیولوژیک هنوز در دست بررسی است.

تکنیک PCR برای قطعات DNA دارای پلی مورفیسم و توالی های ژنی مانند *coa* و *spa* با استفاده از هضم آنزیم های اندونوکلاز بر روی محصول PCR (PCR-RFLP)، برای شناسایی سویه های استافیلوکوکوس/اورئوس استفاده شده است (۲۸ و ۲۹). در این روش از توالی های VNTR^{۱۵} برای تیپ بندی سویه های مختلف استفاده می شود (spa typing, coa typing). پنج لوکوس مختلف VNTR در استافیلوکوکوس/اورئوس مورد استفاده قرار گرفته نتایج آن از نظر قدرت تفکیک و تکرارپذیری مشابه نتایج PFGE گزارش شده است (۳۰).

^{۱۰} Pulsed-field gel electrophoresis

^{۱۱} Restriction fragment length polymorphism

^{۱۲} Multi-locus sequence typing

^{۱۳} Multilocus enzyme electrophoresis

^{۱۴} Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectroscopy

^{۱۵} Variable number tandem repeat

در روش PCR-RFLP، آنالیز RFLP بر روی نمونه هایی که توسط PCR تکثیر شده اند، صورت گرفته و قطعات DNA که توسط آنزیم محدود کننده بر روی محصول PCR تولید می شود (REA-PCR^{۱۶})، بدون نیاز به هیبریداسیون با پروبها، توسط الکتروفورز از هم جدا می شوند. PCR-RFLP روشی آسان و سریع است که نیاز به استفاده از مواد رادیواکتیو ندارند (۳۰).

۱۰-۱ شاخص های بیماریزایی

استافیلوکوکوس/اورئوس یک پاتوژن خطرناک انسانی هم در عفونت های کسب شده از جامعه^{۱۷} و هم در عفونت های بیمارستانی می باشد. یک خصوصیت بیولوژیکی این باکتری، توانایی به کلنیزه شدن بدون علامت آن در افراد سالم می باشد. استافیلوکوکوس/اورئوس کسب شده از جامعه مسئول ریسک بالایی از عفونت ها هستند و این سویه ها به عنوان یک منبع عفونت مهم هستند که بین افراد پخش می شوند. این باکتری می تواند سبب تنوع وسیعی از عفونت ها شود که این عفونت ها می توانند به سه نوع تقسیم شوند. (i) جراحات های سطحی مانند عفونت زخم، (ii) توکسین های عامل مسمومیت غذا، سندرم فلسی شدن پوست (iii) سیستمی و شرایط های تهدید کننده حیات مانند اندوکاردیت، استئومیلیت، پنومونی، آبسه ی مغزی، مننژیت و باکتریما (۳۱).

استافیلوکوکوس/اورئوس به تنوع وسیعی از فاکتورهای بیماریزا مجهز شده است که شامل محصولات ساختاری و ترشحی که عوامل دخیل در عفونت های بیماریزا می باشند.

۱-۱۰-۱ ادهسین های سطحی

استافیلوکوکوس/اورئوس دارای چندین ادهسین سطحی است که به اتصال باکتری به پروتئین های میزبان کمک

^{۱۶} Restriction enzyme assay- PCR

^{۱۷} community-acquired infections

می نماید. این آدهسین ها به وسیله ترکیبات سطحی میکروبی واکنش دهنده با مولکول های ماتریکس اتصالی (MSCRAMM)^{۱۸} در کنار یکدیگر قرار می گیرند. اکثر آن ها با مکانیسم محافظت شده ای به پپتیدوگلیکان دیواره سلولی با پیوند های کووالانت اتصال دارند (۳۲). ۱۱ پروتئین سطحی با خاصیت اتصالی در شرایط *invitro* شناسایی شده است که از مهمترین آنها می توان به پروتئین A /استافیلوکوکوس /ورئوس اشاره کرد. مطالعات بعدی نشانگر وجود ۱۰ پروتئین سطحی دیگر می باشد. از این پروتئین های جدید دو مورد توسط ژن های *SasG* و *SasH* کد می شوند که در بیماری های مهاجم استافیلوکوکی نقش مهمی دارند (۳۳ و ۳۴).

کلیه آدهسین های MSCRAMM ساختار مولکولی نسبتاً مشابهی دارند. در کنار توالی انتهایی آمینی دومین (domain) های عملکردی متفاوتی وجود دارد که خاصیت اتصالی دارند. MSCRAMM در تمام ایزوله های استافیلوکوکوس /ورئوس حضور دارد. با وجودی که در بیماریزایی نقش دارند ولی در جزایر بیماریزایی قرار نداشته و توسط کروموزوم کد می شوند. این امر نشان دهنده ی این است که در سیر تکاملی استافیلوکوکوس /ورئوس این عناصر قبل از عناصر سیار در ژنوم باکتری قرار گرفته اند (۳۵-۳۷).

۱-۱۰-۲ کپسول

میکروارگانیسم هایی که عامل بیماری تهاجمی هستند به طور رایج کپسول پلی ساکارید خارج سلولی تولید می کنند. کپسول ها قدرت بیماریزایی میکروبی را از طریق ایجاد مقاومت باکتری به فاگوسیتوز افزایش می دهند. تولید کپسول توسط استافیلوکوکوس /ورئوس اولین بار در سال ۱۹۳۱ توسط گیلبرت تشریح شد. مطالعات سروتایپی ایزوله های استافیلوکوکی از مجموع سویه های گوناگون انتخاب شده از چندین منطقه جغرافیایی

^{۱۸} Microbial Surface Component Reacting with Adherent Matrix Molecules

نشان داد که سروتیپ ایزوله های ۵ و ۸ به ترتیب برای ۲۵٪ و ۵۰٪ ایزوله ها از انسان ها بازیابی شدند (۳۸). دو نوع اصلی از کپسول های پلی ساکاریدی، CP5 و CP8 می باشد و همه سویه های بالینی / استافیلوکوکوس اورئوس دارای مسیرهای بیوستیزی برای تولید هم CP5 یا CP8 می باشند (۳۹). سروتیپ های کپسولی ۵ و ۸ همچنین توسط سویه های / استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از گاو ها، موش ها، ماکیان، خوک ها و اسب ها نیز ساخته می شوند (۳۸).

۱-۱۰-۳ دیواره سلولی

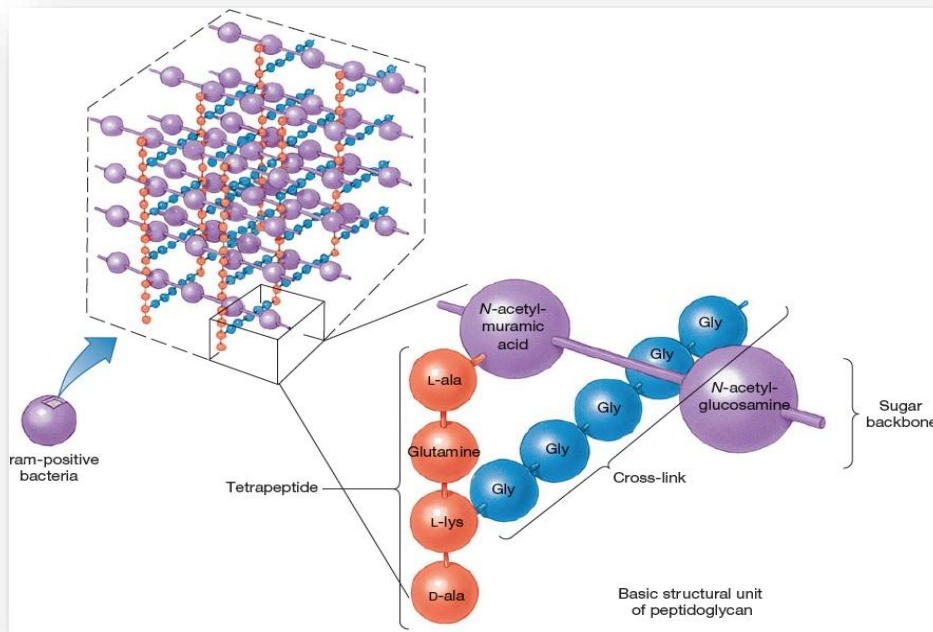
دیواره سلولی / استافیلوکوکوس اورئوس نقش مهمی را در ایجاد عفونت و بیماریزایی ایفا می کند. بیش از چندین دهه از تحقیقات، اطلاعات زیادی را در ارتباط با اپیدمیولوژی، ویرولانسی، ژنتیک، تکامل ژنومی، ترکیبات بیوشیمیایی دیواره سلولی، ساختارهای کریستالی آنزیم های مقاوم به بتالاکتام، ساختار دیواره سلولی و ترکیب موروپتید نوع وحشی مقاوم به متی سیلین و سویه های مقاوم به ونکومايسين را با خود به همراه داشته است (۴۰).

۱-۱۰-۳-۱ پپتیدوگلیکان

پپتیدوگلیکان بخش محافظت شده ی دیواره ی باکتری های گرم منفی و مثبت است. پپتیدوگلیکان از زنجیره ی N- استیل گلوکز آمین و N- استیل مورامیک اسید تشکیل شده که در آن N- استیل گلوکز آمین به شاخه های پنتاپتیدی و تترا پتیدی (L- آلانین، D- گلوتامین، L- لیزین، D- آلانین) متصل می شود (شکل ۱-۳). زنجیره های دی ساکاریدی- پپتیدی با پل های پپتیدی میان D- آلانین و دی آمینو اسید L- لیزین واقع در موقعیت سوم پپتید مجاور پیوند متقاطع برقرار می سازند (۴۰). در / استافیلوکوکوس اورئوس این پل بین پپتیدی یک قطعه پلی گلايسيني است که حاوی ۱ تا ۵ گلايسين می باشد. اضافه شدن گلايسين به پیش سازها توسط ژن های

fem ABC و fhmB رهبری می شود (۱۰). این شاخص ها نشان دهنده ی انعطاف پذیری دیواره و هم چنین مقاومت به متی سیلین و ونکومايسين می باشد.

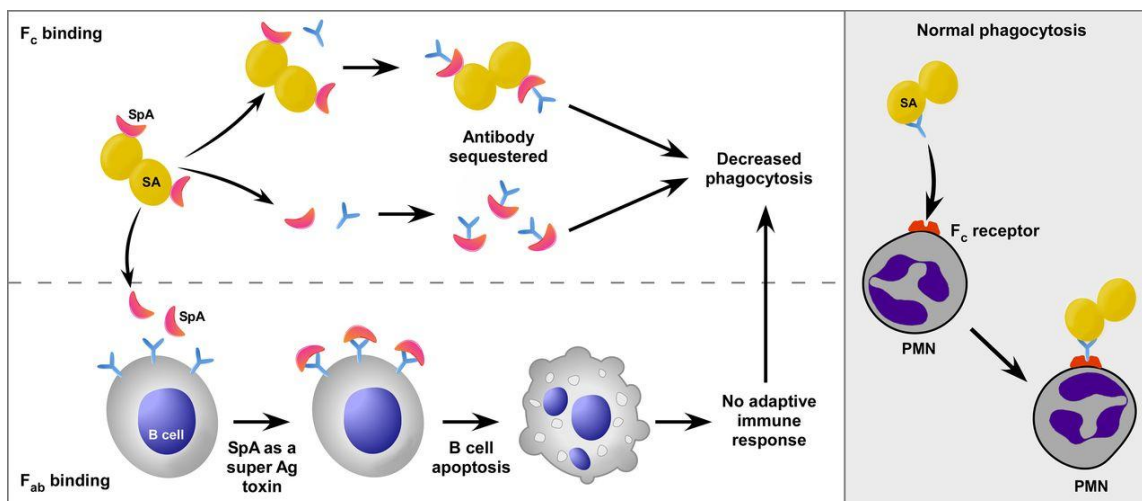
پپتیدوگلیکان جایگاه اصلی برای MSCRAMMs می باشد. از این رو در بیماریزایی نقش غیر مستقیمی ایفا می کند. به عبارت دیگر توسط سیستم ایمنی ذاتی مانند لیپوتیکوئیک اسید شناسایی شده و باعث آزاد سازی سیتوکاین ها شده و سبب ایجاد التهاب می شود (۴۱). بنابراین دور از دسترس نگاه داشتن این ساختارها از سیستم ایمنی میزبان برای باکتری بسیار با اهمیت بوده که این امر به واسطه ی عناصر ضد فاگوسیتی مانند کپسول و پروتئین A تحقق می یابد. به دلیل اهمیت نقش پپتیدوگلیکان، گرده هم آبی آن هدف آنتی بیوتیک هایی مانند β لاکتام ها و آمینوپپتیدهاست. تغییر در سنتز پپتیدوگلیکان پاسخ استافیلوکوک ها نسبت به این گونه داروها و بروز مقاومت می باشد (۵).



شکل ۱-۳. ساختار پپتیدوگلیکان در استافیلوکوکوس اورئوس

۱-۱۰-۳ پروتئین A

پروتئین A یک پروتئین سطحی ۵۶ کیلودالتونی است که جزء MSCRAMM محسوب شده و در دیواره سلولی استافیلوکوکوس اورئوس قرار دارد. این پروتئین توسط ژن *spa* کد می شود و بیان آن توسط سیستم دوجزئی *ArlS-ArlR* کنترل می گردد. این پروتئین در تحقیقات بیوشیمیایی، ایمونولوژیکی و مولکولی بسیار مورد استفاده قرار گرفته است. پروتئین A از ۵ دامین مشابه تشکیل شده که هر دامین قادر است به ایمونوگلوبولین ها به ویژه ایمونوگلوبولین G (IgG) متصل شود. این پروتئین قادر است به هردو ناحیه FC و Fab ایمونوگلوبولین ها اتصال یابد. به کمک این اتصال باکتری از اپسونیزاسیون و فاگوسیتوز در امان می ماند. پروتئین A به کلیه ایمونوگلوبولین های انسانی به جز IgG3 متصل می شود (۴۲).



شکل ۱-۴. اتصال پروتئین A به ایمنوگلوبین ها

ژن کد کننده پروتئین A دارای قطعات مختلفی است. قطعه S کد کننده توالی سیگنال، قطعات A-D مناطق متصل شونده به IgG، قطعه E که همولوگ قطعات A-D است و انتهای کربوکسیلی یا ناحیه X (X_r)^{۱۹} که دارای توالی های ناحیه توالی کوتاه (SSR)^{۲۰} و توالی اتصال دیواره سلولی (X_c)^{۲۱} است (۴۳).

ناحیه X در ژن *spa* بسیار پلی مورف بوده و دارای بازهای تکراری بسیار متغیر (VNTR) است که اندازه آن ۲۴bp می باشد و در بالادست ناحیه X_c قرار گرفته است (۴۴). تغییر پذیری ناحیه SSR در نتیجه حذف و اضافه شدن واحدهای تکراری (VNTR) و ایجاد موتاسیون های نقطه ای است (۴۵). هرگونه تغییری در ناحیه X منجر به تغییر پذیری پروتئین A / استافیلوکوکوس اورئوس می شود. با وجودی که نقش بیولوژیکی ناحیه X ناشناخته است، اما می تواند به عمل دامین متصل شونده به IgG کمک نماید (۴۶). حضور قطعات محافظت شده در مجاورت ناحیه X که بیان کننده توالی *spa* است، امکان استفاده به عنوان پرایمرهایی در روش PCR و تیپ

^{۱۹} X region

^{۲۰} Short Sequence Region

^{۲۱} X cell

بندی های مستقیم را فراهم آورده است. توالی یابی و تقویت قطعه SSR ژن *spa* روش سریع و مفید برای تیپ بندی سویه های مختلف /ستافیلوکوکوس/ اورئوس به ویژه کلون های بیمارستانی است. به دلیل اینکه ناحیه X از درجات متفاوت و بالایی از پلی مورفیسم برخوردار است ، می تواند در بررسی های افتراقی و تیپ بندی (روش *spa typing*) مورد استفاده قرار گیرند (۷۱ و ۷۰).

۱-۱۰-۴ آنزیم های خارج سلولی

• کواگولاز

استافیلوکوکوس/ اورئوس، آنزیم کواگولاز را تولید می کند که توانایی ایجاد پیوند به پروتئین را دارا می باشد. این پروتئین، یک شبه آنزیم است که پلاسمای سیترا ته یا اگزالاته را لخته می کند. مجموعه کواگولاز و پروترومبین از نظر آنزیمی، فعال می شوند و پلیمریزه شدن فیبرین را شروع می کنند. کواگولاز، موجب رسوب فیبرین در سطح استافیلوکوک ها می شود. احتمالاً رسوب فیبرین باعث جلوگیری از بلعیده شدن باکتری ها در سلول های بیگانه خوار و یا جلوگیری از تخریب آنها در درون این سلول ها می گردد. تولید کواگولاز به مفهوم توانایی بالقوه در قدرت تهاجمی و بیماری زایی است (۱۴).

• نوکلئاز

نوکلئاز ترشحی (Nuc) اولین بار توسط Cunningham و همکاران در سال ۱۹۵۶ شناسایی شد اما اخیراً نشان داده شده است که آنزیم نوکلئاز برای بیماری زایی *استافیلوکوکوس/ اورئوس* دارای اهمیت می باشد. این آنزیم در شدت عفونت ریه توسط CA MRSA و در گریختن از تله های نوتروفیل های خارج سلولی نقش دارند. تولید Nuc در سویه های استافیلوکوکوس های حساس به متی سیلین و MRSA حفظ

شده است و بنابراین به عنوان یک مارکر (نشانگر) برای شناسایی مستقیم *استافیلوکوکوس اورئوس* و همچنین در تعیین تیپ بندی *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد استفاده قرار گرفته می گیرد (۴۷).

- لیپاز

اهمیت لیپاز های *استافیلوکوکی*، مانند دیگر لیپاز های میکروبی از اهمیت آنها در متابولیسم لیپید باکتریایی و نقش آنها در فرآیندهای بیماریزایی منشاء می گیرد. بیشتر لیپاز های *استافیلوکوکی* شناخته شده توسط اعضای جنس بیماریزای از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس استافیلوکوکوس اپیدرمیتیس* تولید می شوند. مادامی که این احتمال وجود دارد که لیپاز تداوم حضور این سویه ها را در ترشحات چربی پوست پستانداران حمایت می کند از این رو یک تاثیر غیر مستقیم بر روی ماهیت بیماریزایی آنها دارد و همچنین لیپاز به عنوان یک عامل درگیر مستقیم در بیماریزایی نشان داده شده است. *استافیلوکوکوس اورئوس* در بیماران مبتلا لیپاز تولید می کند. بنابراین این آنزیم با سلول های عفونی *استافیلوکوکوس اورئوس* تولید کننده لیپاز فاگوسیت شده به وسیله گرانولیت های میزبان مداخله می کند. بنابراین نشان دهنده یک درگیری مستقیم لیپاز در بیماریزایی می باشد (۴۸).

- هیالورونیداز

استافیلوکوک ها دسته ی متنوعی از آنزیم ها را تولید می کنند که اجزای بافت میزبان را هیدرولیز می کنند و در گسترش و انتشار باکتری نقش دارند. یکی از آن آنزیم ها، آنزیم هایی هیالورونیداز می باشد که به آن

فاکتور انتشار^{۲۲} هم گفته می شود که اسید هیالورونیک موجود در ماتریکس سلولی بافت همبندی را هیدرولیز می کند (۱۷).

• فیرینولیزین

این آنزیم که همچنین استافیلوکیناز نامیده می شود توانایی حل کردن لخته های فیبرینی را دارا می باشد و در انتشار باکتری می تواند نقش داشته باشد (۱۷).

۱-۱۰-۵ توکسین ها

۱-۱۰-۵-۱ همولیزین ها

/استافیلوکوکوس/ورئوس دارای چهار همولیزین آلفا، بتا، گاما و دلتا می باشند (۱۷). این همولیزین ها باعث لیز اریتروسیت ها و سلول های یوکاریوتی می شوند. آلفا و دلتا به صورت محلول غیرسمی ترشح می شوند و بر روی سلول های یوکاریوتی منفذ ایجاد می کنند (۴۹).

بتاهمولیزین از سایر همولیزین ها متمایز است زیرا یک اسفنگومیلیناز می باشد که با تغییر آنزیماتیک محتوای لیپیدی غشا، آن را تخریب می کند. گاما همولیزین از دو جزء پروتئینی به نام F و S تشکیل شده که در کروماتوگرافی با سرعت بالا (fast) و پایین (slow) جدا می شوند. این آنزیم قادر است علاوه بر گلبول های سفید سایر سلول های یوکاریوتی را نیز لیز نماید به همین خاطر به آن "لکوسیدین" نیز گفته می شود (۱۴). گاما همولیزین توسط دو اپران مجزا کد می شود که یک اپران تنها HlgA (پروتئین s) و دیگری پروتئین s (Hlgc) و پروتئین F (HglB) را کد می کند. پروتئین های F و S کمپلکسی را تشکیل می دهند که باعث

^{۲۲} Spreading factor

ایجاد منفذ در غشا می شوند. همولیزین ها در اکثر سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* وجود دارد، تمام آن ها توسط ژن های کروموزومی کد شده و توسط سیستم *agr* تنظیم می گردند (۵۰).

۱-۱۰-۵-۲ توکسین پنتون والتین

چندین همولوگ از گاما همولیزین تا به حال شناسایی شده است. یکی از این توکسین ها در سال ۱۹۳۲ توسط پنتون و والتین گزارش گردید و نام خود را از کاشفین خود گرفت (۵۱). این توکسین توسط دو ژن *lukF* و *lukS* کد می شود که محصول هر کدام به تنهایی و یا با گاما همولیزین کمپلکس تشکیل می دهند. مانند سایر همولیزین ها این توکسین توسط *agr* تنظیم می شود. برخلاف سایر همولیزین ها توکسین پنتون - والتین (PVL)^{۳۳} توسط فازهای (φSLT) که می توانند PVL را به سایر سویه ها انتقال دهند، کد می شود. هم چنین برخلاف سایر همولیزین ها، PVL تنها در دو درصد سویه های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* یافت می شود (۵۲).

سویه های تولید کننده ی PVL باعث فرونگولیت یا پنومونی هموراژیک شدید و یا هردو در کودکان و بزرگسالان و هم چنین عفونت های پوستی مرتبط با MRSA می شود (۲۱). در مقابل سویه های تولید کننده ی PVL به ندرت مسئول عفونت هایی مانند استئومیلیت ، سپتی سمی و اندوکاردیت می شوند (۵۰).

۱-۱۰-۵-۳ سوپر آنتی ژن ها

توکسین سندرم شوک سمی، توکسین های اگزوفولیاتیو و انتروتوکسین ها از اعضای خانواده بزرگ اگزوتوکسین های پیروژنیک هستند که سوپر آنتی ژن (SAGs)^{۳۴} نامیده می شوند (۴۹). سوپر آنتی ژن ها ، پروتئین هایی

^{۳۳} Panton-Valentine Toxin

^{۳۴} Super Antigens

هستند که سیستم ایمنی را از طریق تماس عادی میان سلول های عرضه کننده آنتی ژن و لنفوسیت های T فعال نمی سازند. بلکه سوپر آنتی ژن ها به قسمت خارجی دامین $V\beta$ تعداد زیادی از لنفوسیت ها متصل می شوند و به طور مستقیم آن ها را به رسپتورهای کلاس MHC II عرضه می نمایند. این تماس غیر اختصاصی تا ۲۰ درصد ذخیره سلول های T را فعال می نماید. نتیجه این فعالیت آزادسازی ناگهانی و بالای سیتوکاین هایی است که باعث پاسخ التهابی می شود که الگویی مشابه با شوک اندوتوکسینی است که منجر به ارتشاح اندوتلیالی، شوک هموراژیک ، نارسایی ارگان ها و احتمالاً مرگ می شود (۵۳ و ۵۴).

جدول ۱-۳. سوپر آنتی ژن های /ستافیلوکوکوس/اورئوس ، ناحیه اتصالی به $V\beta$ و جایگاه ژنی

SAGs reported names	Arbitrarily revised names	Human TCR $V\beta$ ($V\alpha$) specificity	Gene location
SEA		1.1, 5.3, 6.3, 6.4, 6.9, 7.3, 7.4, 9.1, 18	phage
SEB		3, 12, 14, 15, 17, 20	PI
SEC ₁		3, 6.4, 6.9, 12, 13.2, 14, 15, 17, 20	
SEC ₂		12, 13.2, 14, 15, 17, 20	PI
SEC ₃		3, 5, 12, 13.1, 13.2	
SEC canine		3, 5.2, 12, 13.2, 14, 15, 17, 20	
SED		5, 12	plasmid
SEE		5.1, 6.3, 6.4, 6.9, 8.1, 18	not plasmid
SEG		13.6, 14, 15	PI
SEH		$V\alpha 10$	chromosomal?
SEI		1, 5.1, 5.2, 5.3, 23	PI
SEJ	SEIJ	ND	plasmid
SEK	SEIK	5.1, 5.2, 6.7	PI
SEL	SEIL	5.1, 5.2, 6.7, 16, 22	PI
SEM	SEIM	18, 21.3	PI
SEN	SEIN	9	PI
SEO	SEIO	5.1, 7, 22	PI
SEIP		5.1, 6, 8, 16, 18, 21.3	phage
SEQ	SEIQ	2, 5.1, 5.2, 6.7, 21.3	PI
SEIR		3, 11, 12, 13.2, 14	unidentified
SEU	SEIU	ND	PI
TSST-1		2, 4	PI

SEA-SEU, staphylococcal enterotoxin A-U; TSST-1, toxic shock syndrome toxin-1; SEIJ-SEIU, staphylococcal enterotoxin-like toxin type J-U; PI, pathogenicity island

استافیلوکوکوس/اورئوس می تواند سوپرآنتی ژن های مختلفی تولید کند. به جز TSST-1/استافیلوکوکوس/اورئوس ۱۵ انتروتوکسین (انتروتوکسین های استافیلوکوکی A (SEA) ، B ، C ، D ، E ، G ، H ، I ، J ، K ، L ، M ، N ، O ، P ، Q) نیز تولید می نماید (۵۵ و ۵۶). با وجود چندین تفاوت در ساختار اولیه سوپرآنتی ژن ها ، آن ها در کریستالوگرافی دارای ساختار مشابهی می باشند. سوپرآنتی ژن ها از دامین های دایره ایی A و B تشکیل شده است که از صفحات β و مارپیچ α متصل به یکدیگر ساخته شده است. در TSST-1 ناحیه اتصالی به زنجیره $V\beta$ در رسپتور سلول T در ناحیه لولا A-B قرار گرفته است.

سوپرآنتی ژن ها در ۵ گروه تقسیم بندی شده اند (۵۳). در گروه ۱ تنها TSST-1 قرار گرفته است. گروه ۳ شامل سوپرآنتی ژن های استافیلوکوکی (SEA، E، J، D و H) و گروه ۴ شامل سوپرآنتی ژن های استرپتوکوکی (SPE، C، J، G و SME) است. در گروه ۲ و ۵ سوپرآنتی ژن های استافیلوکوکی و استرپتوکوکی جای گرفته اند. گروه ۲ شامل SEB، C و G و گروه ۵ حاوی SEI، K، L و P استافیلوکوکی است. این مطلب نشان دهنده احتمال بالای انتقال افقی ژن میان این دو جنس است (۴۹ و ۵۳ و ۵۷).

۱-۱۰-۵-۳-۱ توکسین اکسفولیاتیو

توکسین های اکسفولیاتیو^{۲۵} (که همچنین به عنوان توکسین های اپیدرومولیتیک شناخته می شوند) از فاکتورهای بیماریزایی مخصوصاً خاص استافیلوکوکوس/اورئوس هستند. این سرین پروتئازهای بسیار اختصاصی تنها کادهرین دسموزومال در لایه های پوست را شناسایی و جدا می کنند که به طور مستقیم مسئول آشکار ساختن سندرم فلسی شدن پوست استافیلوکوکی^{۲۶} (SSSS) می باشند (۵۸). شیوع تولید این توکسین در سویه های

^{۲۵} Exfoliative Toxins

^{۲۶} Staphylococcal Scalded Skin Syndrome

استافیلوکوکوس/اورئوس از لحاظ جغرافیایی متفاوت می باشد اما به طور معمول کمتر از ۵٪ می باشد. دو شکل متفاوت از توکسین اکسفولیاتیو (ETA و ETB) شناسایی شده است که هر دو آنها می توانند بیماری ایجاد کنند. اپیدرمولیتیک نوع A (ETA)^{۲۷} توسط زن های کروموزومی کد شده که مرتبط با فاژ می باشد و مقاوم به حرارت (در ۲۰ درجه سانتی گراد پایدار است). توکسین نوع B (ETB)^{۲۸} به وسیله پلاسمید کد شده و حساس به حرارت می باشد (۱۷ و ۵۹).



شکل ۱-۵. کودک دو ساله درگیر شده با بیماری SSSS

^{۲۷} Exfoliative Toxin A

^{۲۸} Exfoliative Toxin B

۱-۱۰-۵-۳ توکسین سندرم شوک سمی

بسیاری از سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* که از بیماران با سندرم شوک سمی (TSS)^{۲۹} جدا می شوند، توکسین TSST-1 را تولید می کنند که مشابه انتروتوکسین F می باشد (۶۰). این توکسین نیز سوپرآنتی ژن می باشد. ژن مربوط به TSST-1 در تقریباً ۵ تا ۲۵ درصد ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* از جمله MRSA وجود دارد (۴۹). این توکسین وزنی معادل ۲۲ کیلو دالتون داشته و با تحریک آزاد سازی مقادیر بالای اینترلوکین ۱ و ۲ و فاکتور نکروز دهنده تومور (TNF)^{۳۰} باعث ایجاد سندرم شوک سمی می شود. این توکسین توسط باکتری های موجود در خون تولید نمی شود، اما توسط باکتری هایی که در عفونت موضعی وجود دارد تولید شده و به خون می ریزد (۶۱). TSST-1 توسط ژن *tst* کد می شود که جزء عناصر ژنتیکی متحرک بوده و در جزایر بیماریزایی *استافیلوکوکوس اورئوس* قرار دارد (۶۲).

۱-۱۰-۵-۳ انتروتوکسین های استافیلوکوکی

خانواده ای از انتروتوکسین های استافیلوکوکی (A-V) شناسایی شده است که از آن میان انتروتوکسین A شایع ترین عامل مسمومیت غذایی مطرح می باشد (۱۴). این انتروتوکسین ها نسبت به حرارت ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه و هم چنین به اثر هیدرولیز کنندگی آنزیم های معده و ژلنوم مقاوم هستند (۴۹). این توکسین ها را ۳۰ تا ۵۰ درصد از سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* تولید می کنند (۴۹). انتروتوکسین های C و D بیشتر در فرآورده های شیر آلوده یافت می شوند و انتروتوکسین B عامل انتروکولیت با غشا کاذب استافیلوکوکی می باشد (۱۴). این توکسین ها سوپرآنتی ژن بوده و قادرند فعالیت غیر اختصاصی سلول های T را القا کنند و

^{۲۹} Toxic Shock Syndrome

^{۳۰} Tumor necrotizing Factor

سیتوکاین ها را آزاد سازند (۶۳).

۱۱-۱ جزایر بیماریزایی

بررسی های ژنتیکی نشان می دهد که حدود ۵۰٪ پروتئین های کد شده توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* همولوژی بالایی با پروتئین های *باسیلوس سوبتیلیس* دارد. این موضوع نمایانگر این است که هردو ارگانیسم از یک جد مشترک منشأ گرفته اند و پس از آن از هم فاصله گرفته اند. اکثر ژن های مشترک این دو، ژن های *house keeping* هستند که برای رشد و تقسیم ضروری هستند. ژن های متفاوت ژن هایی هستند که اسپورولاسیون در *باسیلوس سوبتیلیس* و بیماریزایی در *استافیلوکوکوس اورئوس* را کد می کنند (۱۴ و ۵۷).

ژنوم *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای تعداد زیادی عناصر متحرک است که اغلب شاخص های بیماریزایی و مقاومت آنتی بیوتیکی و یا هر دو را حمل می کنند (۶۲). این عناصر شامل توالی های *IS*^{۳۱}، ترانسپوزون ها، ویروس ها و جزایر بیماریزایی است. *IS* می تواند در طول کروموزوم جابه جا شده و ژن های خاصی را با تخریب و جایگزینی قالب های باز روخوانی^{۳۲} یا فعال ساختن رونویسی با پروموتورها خاموش یا روشن کنند. اغلب ترانسپوزون ها شاخص های مقاومت به آنتی بیوتیک ها و فلزات سنگین را حمل می کنند. باکتریوفاژها اکثراً یک شاخص بیماریزا را مانند *ETA* و *لکوسیدین PVL* حمل کرده و آن ها را به سایر سویه ها انتقال می دهد (۶۴).

جزایر بیماریزایی ساختارهای متوالی هستند که اندازه شان از ۱۵ تا ۷۰ kb متفاوت است و بسیاری ژن های

^{۳۱} Insertion Elements

^{۳۲} Open reading frame

ویروالانس یا مقاومت را در خود جای می دهند. چندین جزیره بیماریزایی / استافیلوکوکوس / اورئوس (SaPIs)^{۳۳} قبل از ارائه ژنوم کامل استافیلوکوک شناسایی شد که از طریق فاژها منتقل می شوند. SaPI 1 و SaPI 2 مکانی برای ژن *tst* هستند و هم چنین مسئول اغلب موارد TSS می باشند. SaPI 3 و SaPI 4 دارای ژن های اندوتوکسینی هستند. SaPI bov کد کننده توکسین TSST نوع گاوی است و SaPI bap پروتئین ادهسین گاوی را کد می کند که نقش مهمی در ماستیت دارد (۶۱).

آنالیز کامل ژنوم استافیلوکوک ها حضور جزایر بیماریزایی / استافیلوکوکوس / اورئوس را تایید نمود (۳۷ و ۵۷ و ۶۲). ساختارهایی شبیه به SaPIs اما حاوی شاخص های دیگر وجود دارد. این ساختارها شامل ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی مانند SCC، ژن های کپسولی و فاکتورهای اتصال (SaPI bap) است. با شناخت بیشتر ژن های ویروالانس این موضوع مشخص می شود که ژن های ویروالانس بر روی عناصر متحرک قرار دارند و این امر موجب تکامل و تغییر پذیری این ژن ها شده است (۶۲).

۱-۱۱-۱ جزیره مقاومت SCC mec

سویه های MRSA دارای جزیره مقاومت به نام *SCC mec* است که مشابه جزایر بیماریزایی بوده و به معنی کاست کروموزومی استافیلوکوکی^{۳۴} است و *mec* نشان دهنده مقاومت به متی سیلین است. *SCC mec* یک قطعه ۱۵ تا ۶۰ kb است و در سویه های حساس به متی سیلین وجود ندارد. در اطراف این جزایر توالی های معکوس و تکراری وجود دارد که اینتگره شدن آنها را به درون کروموزوم تسهیل می کند (۶۵).

mecA پروتئین متصل شونده به پنی سیلین خاصی را به نام PBP2a کد می کند که تمایل بسیار پایینی برای

^{۳۳} Staphylococcal pathogenicity islands

^{۳۴} Staphylococcal Cassette Chromosome

اتصال به متی سیلین و سایر داروهای β -لاکتام دارد (۹۳). از این رو PBP2a مسئول مقاومت ذاتی MRSA به تمامی آنتی بیوتیک های β -لاکتام می باشد. ژن *mecA* توسط *mec RI* و *mec I* که شاخص های تنظیمی هستند کنترل می گردند که همولوگ *bla RI* و *bla I* بوده که تنظیم کننده ژن های پنی سیلیناز (*bla*) می باشند. *mec RI* (*bla RI*) یک ریسپتور غشایی و *mec I* (*bla I*) یک رپرسور غشایی را کد می کند. در حضور پنی سیلین قسمت خارج سلولی *mec RI* (*bla RI*) ناحیه سیتوپلاسمی را شکست اتوکاتالیتیکی می دهد. پپتید خرد شده داخل سیتوپلاسمی به عنوان متالوپروتئاز عمل کرده و باعث شکست رپرسور *mec I* (*bla I*) می گردد و منجر به مهار بیان ژن های رپرسوری می شود (۹۴). ژن *mecA* دارای یک یا دو کپی از IS431 است که به عنوان جاذب ژن های دیگر عمل کرده و می تواند ورود سایر شاخص ها را مانند ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی را تسهیل نماید (۶۶).

چهار گروه از SCC *mec* براساس ساختار *ccrA* – *ccrB* و کمپلکس های *mecA* جداسازی شده است (۶۶-۶۸). این چهار تیپ کلون های مختلف MRSA را تشکیل می دهند. تیپ I، II و III به کلون های بیمارستانی (HA-MRSA)^{۳۵} تعلق دارند. آن ها دارای سایر مقاومت های دارویی می باشند و اندازه بزرگتری (۳۵ تا ۶۰ kb) داشته و از این رو جابه جایی و حرکت آن ها دچار مشکل است. تیپ IV به عنوان کلون های بر گرفته از جامعه (CA-MRSA)^{۳۶} شناخته می شود (۶۸). از نظر اندازه بسیار کوچکتر (حدود ۱۵ kb) از کلون های بیمارستانی است و ژن های مقاومت به سایر آنتی بیوتیک ها را حمل نکرده و حرکت بیشتری دارند. اکثراً همراه با توکسین پنتون – والتین هستند که توسط باکتریوفاژ کد می شود و یا دارای ژن های اگزوتوکسین

^{۳۵} Hospital acquired Methicillin Resistant staphylococcus aureus

^{۳۶} Community acquired Methicillin Resistant staphylococcus aureus

های استافیلوکوکی اند (set)^{۳۷} که در جزایر vSaβ یا SapI3 قرار دارند. به طور کل تجمع این عناصر باعث افزایش ویرولانسی ارگانسیم می شوند. این مطلب که سویه های CA-MRSA از سویه های بیمارستانی منشا گرفته باشند، بعید بنظر می رسد. احتمالاً سویه های CA-MRSA مستقل از سویه های بیمارستانی ظاهر شده اند و SCC mec را از استافیلوکوک های کوآگولاز منفی دریافت کرده اند و به دلیل استفاده بی رویه β - لاکتام ها گسترش پیدا کرده اند (۶۹).

۱۲-۱ عفونت های بیمارستانی

عفونت های بیمارستانی، همزمان با گسترش بیمارستان ها همواره یکی از مشکلات عمده بهداشتی و درمانی بوده و با افزایش طول مدت بستری شدن در بیمارستان، موجب افزایش ابتلاء و مرگ و میر شده و در نتیجه هزینه های بیمارستانی را به شدت افزایش می دهد. حدود ۷۰٪ عفونتهای بیمارستانی توسط هفت پاتوژن به وجود می آید، که از میان ارگانسیمهای گرم مثبت: استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکهای کوآگولاز منفی و انتروکوک ها و از میان ارگانسیم های گرم منفی: اشریشیا کلی، سودوموناس آئروژینوزا، انتروباکتر و کلبسیلا پنومونیه به عنوان شایعترین پاتوژن های بیمارستانی به شمار می روند (۷۰).

در دو دهه گذشته، طیف عوامل بیماری زا بیمارستانی از باکتری های گرم منفی به سمت باکتری های گرم مثبت و قارچ ها سوق پیدا کرده که بسیار مسئله ساز شده است. فاکتور مهم دیگر ظهور افزایش مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها در استافیلوکوک ها و انتروکوک ها به عنوان عوامل بیماری زا بیمارستانی می باشد. تخمین زده می شود که میزان ابتلا بیمارستانی برای استافیلوکوکوس اورئوس ۱۶/۴ درصد در بعضی از بخش ها مثل بخش مراقبت

^{۳۷} Staphylococcal exotoxin genes

ویژه (ICU) است (۷۱).

استافیلوکوکوس/ورئوس یکی از مهمترین عوامل ایجاد کننده عفونتهای بیمارستانی خصوصاً عفونت های ناشی از زخم های جراحی، پنومونی و باکتری می باشد. ناقلین یکی از مهمترین منابع برای عفونت محسوب می گردند. احتمال ابتلا به عفونت استافیلوکوکی در افراد ناقل بسیار زیاد است (۲). وضعیت ناقلی بلافاصله بعد از تولد ایجاد می شود، بطوریکه ۶-۲۴٪ نوزادان بعد از ۳ الی ۴ روز بستری شدن در بخش های مربوطه ناقل این باکتری می گردند. حامل بودن به عوامل اپیدمیولوژیک خاصی وابسته است. بطوریکه پزشکان ۵۰٪، پرستاران ۷۰٪ و کارگران بخش های مختلف تا ۹۱٪ حامل این باکتری می باشند که بیش از جمعیت عادی (۳۵٪) است (۷۲).

استافیلوکوکوس/ورئوس بویژه سویه های MRSA چالش مهمی در کنترل عفونت در بیمارستان ها محسوب می شود. احتمالاً علت آن نبود درمان سریع و مناسب برای سویه های MRSA می باشد. داروهای در دسترس سمی و یا گران هستند و نسبتاً ناکارآمدند و مقاومت آنتی بیوتیکی گسترده ایی در اکثر نمونه های تازه جدا شده مشاهده می شود. مطالعات انجام شده نشانگر وجود چرخه انتقال استافیلوکوکوس/ورئوس در میان محیط، بیمار و پرسنل بیمارستانی است، که به علت افزایش طول مدت بستری شدن بیمار در بیمارستان ها، این چرخه اهمیت پیدا کرده است (۷۲).

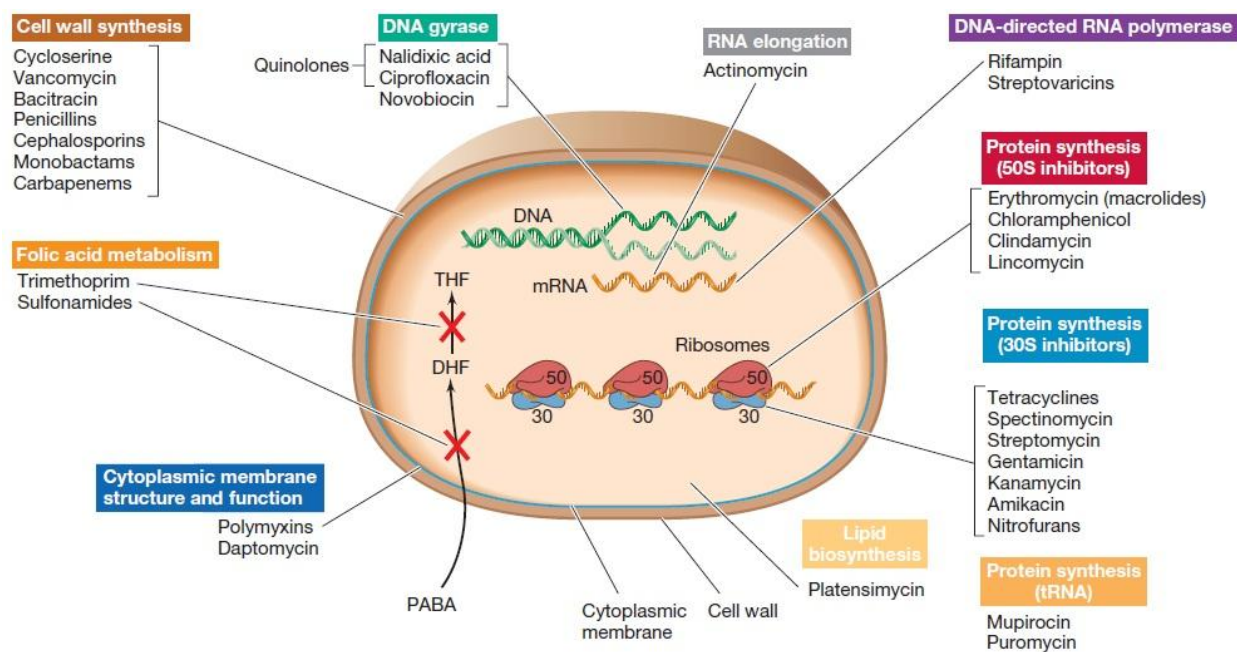
۱-۱۳ آنتی بیوتیک ها و مکانیسم های مقاومت

عفونت های ایجاد شده توسط استافیلوکوکوس/ورئوس خطر جدی برای نظام سلامت ایجاد می کند. این باکتری یکی از گسترده ترین و بیماریزاترین پاتوژن های بیمارستانی می باشد و معمولاً به آنتی بیوتیک های زیادی مقاوم می باشد که درمان عفونت را دشوار کرده است (۵).

آنتی بیوتیک ها را می توان به چندین طریق طبقه بندی کرد. یک طبقه بندی بر اساس عملکرد آنتی بیوتیک ها است که چطور به باکتری ها حمله می کنند، و دیگر الگوی طبقه بندی بر اساس شکل و ساختمان شیمیایی آنها است (۷۳).

مکانیسم های عملکرد داروهای آنتی بیوتیک می توانند در بین چهار گروه مورد بحث قرار گیرند (۱۴).

۱. ممانعت از سنتز دیواره سلولی
۲. ممانعت از عملکرد غشای سلولی
۳. ممانعت از سنتز پروتئین (ممانعت از سنتز ترجمه و رونویسی ماده ژنتیکی)
۴. ممانعت از سنتز اسید نوکلئیک



شکل ۱-۶. نوع فعالیت برخی از آنتی بیوتیک های عمده

جدول ۱-۴ انواع عملکرد و مکانیسم های مقاومت آنتی بیوتیک های رایج مورد استفاده

Antibiotic class	Example(s)	Target	Mode(s) of resistance
β -Lactams	Penicillins (ampicillin), cephalosporins (cephamycin), penems (meropenem), monobactams (aztreonam)	Peptidoglycan biosynthesis	Hydrolysis, efflux, altered target
Aminoglycosides	Gentamicin, streptomycin, spectinomycin	Translation	Phosphorylation, acetylation, nucleotidylation, efflux, altered target
Glycopeptides	Vancomycin, teicoplanin	Peptidoglycan biosynthesis	Reprogramming peptidoglycan biosynthesis
Tetracyclines	Minocycline, tigecycline	Translation	Monooxygenation, efflux, altered target
Macrolides	Erythromycin, azithromycin	Translation	Hydrolysis, glycosylation, phosphorylation, efflux, altered target
Lincosamides	Clindamycin	Translation	Nucleotidylation, efflux, altered target
Streptogramins	Synercid	Translation	C-O lyase (type B streptogramins), acetylation (type A streptogramins), efflux, altered target
Oxazolidinones	Linezolid	Translation	Efflux, altered target
Phenicol	Chloramphenicol	Translation	Acetylation, efflux, altered target
Quinolones	Ciprofloxacin	DNA replication	Acetylation, efflux, altered target
Pyrimidines	Trimethoprim	C ₁ metabolism	Efflux, altered target
Sulfonamides	Sulfamethoxazole	C ₁ metabolism	Efflux, altered target
Rifamycins	Rifampin	Transcription	ADP-ribosylation, efflux, altered target
Lipopeptides	Daptomycin	Cell membrane	Altered target
Cationic peptides	Colistin	Cell membrane	Altered target, efflux

۱-۱۳-۱ بتالاکتام ها

این گروه از آنتی بیوتیک ها به دلیل داشتن بخش شیمیایی فعال به عنوان حلقه بتالاکتام به این نام شناخته می شوند. این آنتی بیوتیک ها بخشی از شکل دیواره سلولی را تقلید می کنند و آنزیم های طبیعی درگیر در جمع شدن ساختار سلول را غیرفعال می کنند. بدون دیواره سلولی اکثر باکتری ها ترکیده و در نهایت می میرند. چهار زیرگروه در این طبقه بندی قرار می گیرند: پنی سیلین ها، سفالوسپورین ها، کارباپنم ها و مونوباکتام ها. پنی سیلین ها جزء گروه اصلی بتالاکتام ها می باشند که در کنار تغییرات به نسخه های دیگری از جمله آمپی سیلین، آموکسی سیلین و متی سیلین تبدیل می شوند. سفالوسپورین ها شامل سفالوتین، سفوکسیتین، سفتازیدیم و سفپیم هستند. کارباپنم ها شامل امی پنم، مروپنم و تینامایسین هستند و مونوباکتام شامل آزترونام هستند (۷۳).

باکتری ها می توانند عموماً از طریق سه مکانیسم به آنتی بیوتیک های بتالاکتام مقاوم شوند: (۱) جلوگیری از واکنش بین آنتی بیوتیک و PBP هدف. (۲) تغییر در اتصال آنتی بیوتیک به PBP و (۳) هیدرولیز آنتی بیوتیک ها توسط بتا لاکتامازها. مکانیسم اول به علت وجود غشای خارجی تنها در باکتری های گرم منفی می شود (۱۷).

مکانیسم عمده مقاومت به بتالاکتام ها در *استافیلوکوکوس اورئوس* تولید پنی سیلیناز است که توسط ژن *bla* پلاسمیدی کد می شود. این ژن قابل القا است و قبل از ژن های تنظیمی *blaR* و *blaI* قرار گرفته است. پنی سیلیناز یک آنزیم ترشحی است که پنی سیلین و سایر ترکیبات مشابه را به پنی سیلوئیک اسید غیر فعال تجزیه می کند (۴۹). *استافیلوکوکوس اورئوس* های تولید کننده پنی سیلیناز به سرعت پس از معرفی پنی سیلین در اواسط دهه ۱۹۴۰ بوجود آمدند. این ارگانیسم ها امروزه در بیمارستان ها و جوامع بسیار شایع هستند نزدیک به ۸۰ درصد ایزوله ها را به خود اختصاص می دهند (۷۳ و ۷۴). اولین بار در سال ۱۹۶۱ در کشور انگلستان پس از بررسی عفونت ایجاد شده توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* و مشخص شدن مقاومت این باکتری نسبت به درمان، سویه های MRSA تعریف شدند. عواملی نظیر اقامت طولانی مدت در بیمارستان، استفاده بی رویه از آنتی بیوتیک ها، عدم رعایت بهداشت فردی و جمعی، عدم آگاهی از نحوه ی مصرف آنتی بیوتیک ها قبل از آمدن به بیمارستان می توانند از جمله علل مستعد کننده ظهور *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین (MRSA) باشند (۷۵ و ۷۶).

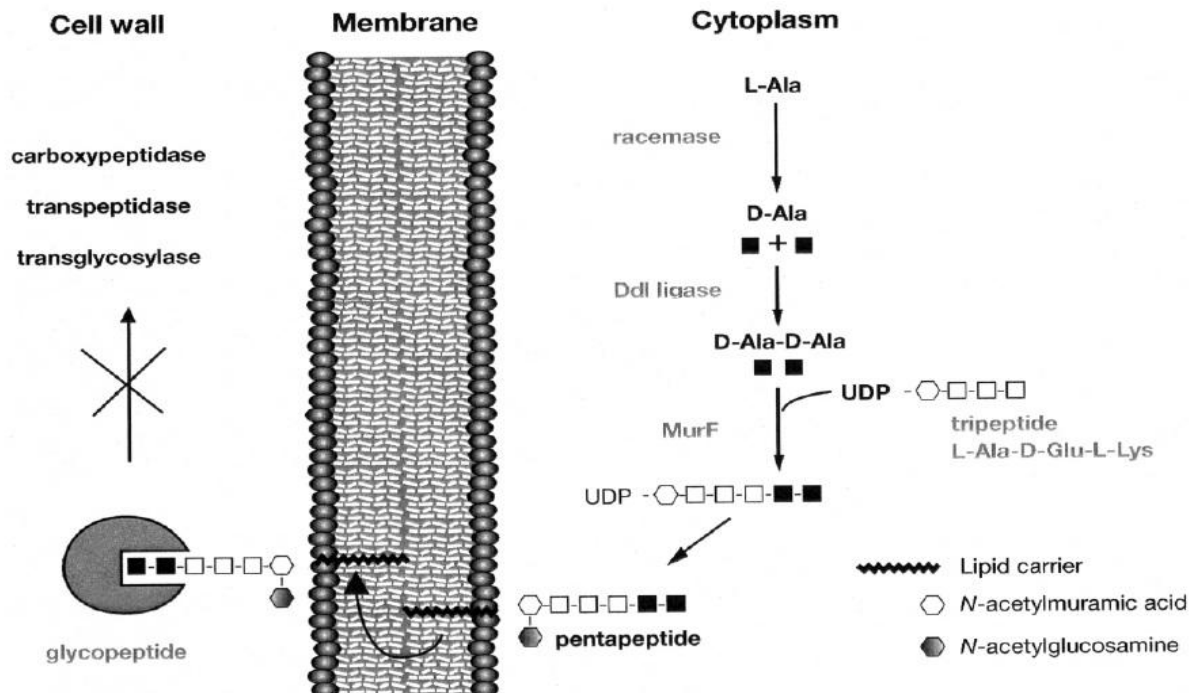
اوایل مواجهه با ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین تنها در بیمارستان ها بود، اما در اواخر دهه ۱۹۹۰ نخستین کلون های حاد *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه (community acquired MRSA) که مشخصه بارز آنها وجود سم لوکوسیدین پنتون ولتاین بود، شناسایی

و با سرعت غیرقابل باوری گسترش پیدا کرد (۷۷). آنها به سرعت در سراسر جهان، ابتدا تنها در جوامع و بعدها در بیمارستان ها و مراکز درمانی، گسترش یافتند و حتی جایگزین ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین اکتسابی از بیمارستان (*hospital acquired MRSA*) شدند. به همین دلیل، امروزه افتراق میان ایزوله های *CA-MRSA* و بیش تر ایزوله های *HA-MRSA* واجد مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی به یک چالش بزرگ تبدیل شده است (۷۸ و ۷۹).

۱-۱۴ گلیکولپیدها

ونکومایسین معروف ترین آنتی بیوتیک از این گروه می باشد که سنتز پپتیدوگلیکان را در باکتری های گرم مثبت در حال رشد را مختل می کند. ونکومایسین با *D-آلانین _ D-آلانین* انتهایی زنجیره جانبی پتاپتید واکنش داده و از تشکیل پل عرضی بین زنجیره های پپتیدوگلیکان ممانعت می کند. از ونکومایسین برای درمان عفونت های ناشی از *استافیلوکوک* مقاوم به اگزاسیلین و سایر باکتری های گرم مثبت مقاوم به آنتی بیوتیک های بتا لاکتام استفاده می شود (۱۷). دو نوع مقاومت نسبت به گلیکوپتیدها در ایزوله های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* گزارش شده است : ۱) مقاومت حدواسط (*VISA*) ۲) مقاومت کامل (*VRSA*) هر دو فنوتیپ دارای مکانیسم های مختلفی هستند و در شیوع اپیدمیولوژیک و بالینی باهم فرق دارند (۱۴).

مقاومت حدواسط گلیکوپتید از موتاسیون های کروموزومی سرچشمه می گیرد که ساختار پپتیدوگلیکان دیواره سلولی را متاثر می سازد (۸۰).



شکل ۷-۱. بیوسنتز پپتیدوگلیکان و مکانیسم عملکرد ونکومايسين

۱-۱۵ آمینوگلیکوزیدها

در بین آنتی بیوتیک های با طیف وسیع بیشترین کاربرد را دارا می باشند. بیشتر آمینوگلیکوزیدها از نوع باکتریسیدال هستند. یکی از فاکتورهایی که این دسته از آنتی بیوتیک ها را ارزشمند می سازد ویژگی عملکرد سینرژسمی آن با دیگر گروه های آنتی بیوتیکی می باشد. علیرغم داشتن سمیت کلیوی، سمیت شنوایی و مقاومت باکتریایی، چند آنتی بیوتیک از این خانواده برای چندین دهه مصرف ویژه خود را به همراه دارد و نقش مهمی را در درمان و پیشگیری عفونت های ناشی از استافیلوکوک ها ایفا می کنند (۸۱).

این آنتی بیوتیک ها از غشای خارجی (در باکتری های گرم منفی)، دیواره سلولی و غشای سیتوپلاسمی عبور کرده و وارد سیتوپلاسم باکتری می شوند و در سیتوپلاسم با اتصال غیرقابل برگشت به پروتئین های زیرواحد 30S ریبوزوم از سنتز پروتئین های باکتریایی ممانعت می کنند. اتصال به ریبوزوم ها دو اثر به همراه دارد که

عبارتند از : ۱) تولید پروتئین های غیر صحیح، به واسطه اشتباه در خواندن mRNA و ۲) اختلال در سنتز پروتئین به واسطه رهایی زود هنگام ریبوزوم از mRNA (۱۷).

اصلی ترین مکانیسم مقاومت غیرفعال سازی آنزیمی دارو می باشد. این نوع مقاومت توسط آنزیمهای تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها به وجود می آید. این آنزیمها به سه رده مختلف بر اساس فعالیت تغییر دهنده آنها طبقه بندی می شوند که شامل: آمینوگلیکوزید استیل ترانسفرازها (AACs)، آمینوگلیکوزید فسفریل ترانسفرازها (APHs) و آمینوگلیکوزید نوکلئوتیدیل ترانسفرازها (ANTs) هستند. این سه آنزیم توسط ژنهای $ant(4')Ia$, $aph(3')IIIa$, $aac(6')-Ie/aph(2'')$ کد می شوند. ژنهای تولید کننده این آنزیم ها بر روی ترانسپوزون ها و عناصر ژنتیکی متحرک همانند ایتنگرون ها و پلاسمیدها قرار دارند و به طور وسیعی در بین باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی منتشر می شوند (۸۲).

۱۶-۱ ماکرولید - لینکوزامید - استرپتوگرامین B

ماکروئید ها آنتی بیوتیک های با طیف وسیع هستند. این دسته از آنتی بیوتیک ها برای درمان عفونت های ناشی از گونه های کمپیلوباکتر و باکتری های گرم مثبت در بیمارانی که نسبت به پنی سیلین آلرژی دارند تجویز می شوند. تغییر در ساختار ماکروئید منجر به تولید عوامل (ماکروئیدهای) جدیدتر مانند آزیترومایسین و کلاریترومایسین شده است. اکثر باکتری های گرم منفی به ماکروئیدها مقاوم می باشند. این آنتی بیوتیک ها به واسطه ی اتصال برگشت پذیر با 23SrRNA زیرواحد 50S ریبوزوم موجب مهار طویل شدن پلی پتید می گردد (۱۷).

مقاومت به این آنتی بیوتیک ها در اثر تغییر در جایگاه هدف دارو، تغییر خود دارو و کاهش تجمع داخل سلولی

دارو روی می دهد. در سویه های /استافیلوکوکوس/اورئوس شایعترین مکانیسم مقاومت تغییر ریبوزومی و ترشح فعال دارو به خارج سلول توسط پمپ های افلاکس می باشد. تغییرات ریبوزومی در اثر ژن های erm (Erythromycin methylase) روی می دهد که یک آنزیم متیلاز را کد کرده و یک یا دو گروه متیل به 23rRNA اضافه می کند (۸۳ و ۸۴).

۱۷-۱ کوئینولون ها

کینولون ها از جمله آنتی بیوتیک هایی هستند که برای سالیان متمادی جهت درمان عفونت های ادراری به کار برده شدند. این آنتی بیوتیک ها صناعی بوده و محل اثر آنها، آنزیم DNA gyrase و توپوایزومراز IV می باشد. در باکتری های گرم منفی زیرواحد زیر واحد A از DNA ژیراز هدف اصلی کینولون ها بوده است در حالی که در باکتری های گرم مثبت هدف اصلی کینولون ها توپوایزومراز از نوع IV می باشد (۱۷ و ۸۵).

تغییر در دو حلقه مرکزی کینولون ها موجب تولید کینولون های جدیدتر شده که تحت عنوان فلوروکینولون ها مطرح می باشند. هم اکنون کینولون های جدیدتر مانند سیپروفلوکساسین، لووفلوکساسین، گتی فلوکساسین و موکسی فلوکساسین جایگزین نالیدیکسیک اسید شده اند (۱۷).

فلوروکینولون ها آنتی بیوتیک های وسیع الطیف هستند که به عنوان یک جایگزین مناسب برای درمان MRSA های مقاوم به داروهای بتالاکتام و یا ونکومایسن شناخته می شوند اما در سال های اخیر گزارشات زیادی از بروز مقاومت در این باکتری ها نسبت این گروه از آنتی بیوتیک ها وجود دارد (۸۶).

سه نوع مکانیسم مقاومت در بین استافیلوکوک ها بیان شده است. اولین، جهش در ژن های gyrA و gyrB که کد کننده زیرواحدهای DNA می باشند دومین نوع مکانیسم، جهش در ژن های grlA و grlB که زیر واحد

های DNA توپوازومراز IV را کد می کنند و سومین نوع آن فعالیت پمپ افلاکس که کد توسط ژن *norA* میانجی گیری می شود (۸۷).

۱۸-۱ تتراسایکلین

تتراسایکلین و مینوسایکلین به عنوان مهار کننده مرحله طویل سازی پروتئین مطرح هستند و روی زیر واحد ۳۰S ریبوزوم اثر دارند. آنها به منطقه 16srRNA متصل می شوند و از اتصال آمینو اسیل tRNA به جایگاه A ریبوزوم جلوگیری می کنند و منجر به هیدرولیز غیر موثر GTP به واسطه فاکتور طویل کننده Tu می شوند و این امر باعث تحمیل انرژی به سلول می شود. مکانیسم اصلی مقاومت بر علیه تتراسایکلین در *استافیلوکوکوس اورئوس* حفاظت ریبوزوم به واسطه پروتئین های مشابه فاکتور طویل سازی به نام های Tet M و Tet O است. ترشح فعال دارو به واسطه پمپ های Efflux که محصول ژنهای tet L و tet K است باعث خروج دارو از باکتری می شود (۸۸).

۱۹-۱ ریفامپین

این دارو باعث مهار عملکرد آنزیم RNA پلیمراز می شود و از فرایند رونویسی در باکتری ها جلوگیری می کند. استفاده از این دارو به تنهایی، منجر به افزایش مقاومت به ریفامپین می شود. مقاومت به ریفامپین در اثر جهش در ژن زیر واحد بتا (*rpoB*) آنزیم RNA پلیمراز ایجاد می شود (۸۹).

۲۰-۱ تری متوپریم - سولفامتوکسازول

سولفانامیدها آنتی متابولیت هایی هستند که با پارا آمینوبنزوئیک اسید^{۳۸} رقابت نموده و موجب ممانعت از سنتز

^{۳۸} PABA

اسیدفولیک مورد نیاز در ارگانیسم می شود. تری متوپریم نیز آنتی متابولیتی است که به واسطه مهار دی هیدروفولات ردوکتاز و ممانعت از تبدیل دی هیدرو فولات به تتراهیدروفولات ، از سنتز پورین ها ممانعت می نماید. از ترکیب تری متوپریم با سولفامتوکسازول ترکیبی ایجاد می شود که اثر سینرژیسم داشته و در دو مرحله در سنتز اسید فولیک اختلال ایجاد می کند. مقاومت به واسطه ممانعت از نفوذ دارو و کاهش میل ترکیبی دی هیدرو فولات ردوکتاز صورت می پذیرد (۱۴).

۲۱-۱ لینوزولید

لینوزولید به کلاس جدید آگزازولیدون ها تعلق دارند که عملکرد آن ها مهار سنتز پروتئین در باکتری های گرم مثبت است. این ترکیبات باعث مهار شکل گیری N- فرمیل متیونین - tRNA، کمپلکس اولیه در ریبوزوم ۳۰S، می شوند. لینوزولید به میزان بالایی در درمان پنومونی ، باکتری می و عفونت های بافت نرم و پوست ناشی از استافیلوکوک های مقاوم به ونکومايسين استفاده می شود (۹۰).

۲۲-۱ استرپتوگرامین ها

کوئینوپرسیتین - دالفوپرسیتین ترکیبی از دو مشتق پریستینامین است. این دو عامل به صورت هم زمان فعالیت می کنند تا عملکرد باکتری کشی علیه باکتری های گرم مثبت داشته باشند. مکانیسم عملکرد آن ها اتصال غیرقابل برگشت به ۵۰S ریبوزوم است. این آنتی بیوتیک ها علیه استافیلوکوک های مقاوم به نفی سیلین فعالیت می کنند. مقاومت نسبت به این داروها نادر است (۹۰).

۲۳-۱ نقش ژن ها در مقاومت ضد میکروبی / استافیلوکوکوس اورئوس

وقتی باکتری در مجاورت مواد ضد میکروبی قرار گیرد، دارو وارد باکتری شده و به هدف مورد نظرش برسد،

ممکن است رشد باکتری را متوقف و یا باکتری کشته شود. در این حالت باکتری، حساس نامیده می شود و یا دارو داخل باکتری شده، ولی اثر کشندگی بر باکتری ندارد که در این حالت تولرانس یا غیر حساس نامیده می شود. اصطلاح «مقاوم» وقتی که دارو تجزیه یا تخریب شده باشد و اصطلاح «تولرانس» وقتی که آنتی بیوتیک وارد باکتری شده، ولی قادر به توقف رشد باکتری و رسیدن به هدف در باکتری نمی باشد، گفته می شود. دو مکانیسم مقاومت به ضد میکروبی ذاتی به واسطه کروموزومی و اکتسابی وجود دارد، که ممکن است بر اثر موتاسیون کروموزومی یا پلاسمید اکتسابی و یا ترانسپوزون می باشد. مقاومت به استرپتومایسین، ریفامپین، نوویوسین، نالیدیکسیک اسید، اریترومایسین و اسپکتینومایسین ممکن است به واسطه کروموزومی باشد که در مقایسه با باکتری های مقاوم با منشا، پلاسمیدی، ویروالانس کمتری دارند (۹۱-۹۵). مقاومت به استرپتومایسین به علت موتاسیون، مربوط به تغییرات در پروتئین های ریبوزومی است که اتصال دارو به هدف را کاهش می دهد و این در آزمایشگاه و ایزوله های بالینی رخ داده و ثابت است (۹۶ و ۹۷). مقاومت باکتری به جنتامایسین، کانامایسین، توبرامایسین، نئومایسین و استرپتومایسین با منشاء پلاسمیدی، مربوط به آنزیم هایی است که داروها را تغییر می دهند (۹۸ و ۹۹). بطور واضح، پلاسمیدها یک نقش مهم در زنده بودن باکتری ها و توانایی انتشار ژن های مقاوم در جامعه را دارند. ترانسپوزون ها (اجزای قابل انتقال) در انتشار اپیدمیکی مقاومت آنتی بوتیکی بین جمعیت های باکتریایی نیز نقش دارند. این اجزا می توانند بین پلاسمیدها و کروموزوم ها و برعکس حرکت نمایند (۱۰۰).

۲۴-۱ انتقال ژن در استافیلوکوک ها

چهار مکانیسم اصلی انتقال ژن، به نام کنژوگیشن، ترانسفورماسیون، کنژوگیشن به واسطه فاژ و ترانس داکشن وجود دارد.

۱-۲۴-۱ کنژوگیشن^{۳۹}

کنژوگیشن، مکانیسم انتقالی است که به تماس سلول به سلول نیاز دارد و بین استافیلوکوک ها نیز رخ می دهد و DNAase، سیترات، EDTA، یون های کلسیم و سرم های انسانی بر این مکانیسم اثر ندارند (۹۸-۱۰۱). دو نوع پلاسمید کنژوگیشن و غیر کنژوگیشن وجود دارد. پلاسمیدهای کنژوگیشن خود به خود منتقل می شوند ولی پلاسمیدهای غیر کنژوگیشن برای انتقال به برانگیختن به وسیله پلاسمیدهای کنژوگیشن نیاز دارند (۱۰۲).

پلاسمیدهای با وزن مولکولی ۵۴-۳۸ کیلو باز کدکننده مقاومت به جنتامایسین، توبرامایسین و کانامایسین با دوز بالا، بین گونه های مختلف استافیلوکوک های /اورئوس در سطوح جذب کننده خشک مانند پوست انسان، بافت و گازهای جراحی با بالاترین سرعت انتقال می یابند. عوامل مقاومت بین استافیلوکوک یک گونه یا یک جنس و جنس های مختلف از طریق کنژوگیشن منتقل می یابند (۱۰۳).

۱-۲۴-۲ ترانسفورمیشن^{۴۰}

ترانسفورمیشن، مکانیسمی است که در آن، DNA آزاد و خالص باکتری تهیه و در ژنوم سلول گیرنده زن، داخل می شود. ترانسفورمیشن موفق، بستگی به وزن مولکولی پلاسمید حامل و زمان کسب بستگی دارد. در طبیعت، نیز ترانسفورمیشن رخ می دهد. ترانسفورمیشن در استافیلوکوکوس /روئوس به غلظت بالای یون کلسیم یا باکتریوفاژ در حالت پروفاژ و یا فعال نیاز دارد که در صورت فقدان این شرایط، سرعت انتقال ترانسفورمیشن کاهش می یابد (۹۴ و ۹۵).

^{۳۹} Conjugation

^{۴۰} Transformation

۱-۲۴-۳ کنژوگیشن به واسطه فاژ^{۴۱}

کنژوگیشن به واسطه فاژ، مکانیسمی است که به لیزوژن گیرنده یا دهنده پلاسمید نیاز دارد (۹۸). وقتی باکتری گیرنده پلاسمید به حالت لیزوژن باشد، کنژوگیشن به واسطه فاژ بین گونه های استافیلوکوک ها در بدن موجود زنده با سرعت بالا ($\geq 10^{-1}$) خواهد بود و وجود یون های دی والان با غلظت بالا و اندازه بزرگ پلاسمید ضرورت دارد. پلاسمید ها به اندازه ۲۹-۲/۷ کیلوباز، با سرعت کم $10^{-8} \times 1/8$ به ازای هر باکتری گیرنده عامل مقاومت) منتقل شوند. به وسیله این مکانیسم، انتقال عوامل مقاومت به جنتامایسین با سرعت بین 10^{-3} و 10^{-6} در بدن موجود زنده (in vivo) و آزمایشگاه (in vitro) نیز گزارش گردیده است (۱۰۴ و ۱۰۵).

۱-۲۴-۴ ترانسداکشن^{۴۲}

ترانس داکشن، مکانیسمی است که در آن یک قطعه از کروموزوم یا پلاسمید دارای ژن کد کننده عامل مقاومت به وسیله باکتریوفاژ به باکتری گیزنده منتقل می گردد (۹۴). دو نوع مکانیسم ترانسداکشن عمومی و محدود وجود دارد. در ترانسداکشن عمومی، فاژ یک قطعه از کروموزوم یا پلاسمید دهنده عامل مقاومت را حمل می کند در ترانسداکشن محدود، گونه های معین فاژ فقط می توانند تعداد کمی از کروموزوم باکتریایی را منتقل نمایند و این پدیده فقط در باکتریوفاژهایی رخ می دهد که در کروموزوم های باکتریایی اینتگره شده باشند. بعضی عوامل از قبیل یون های سترات می توانند در فعالیت فاژ تاثیر داشته باشند (۱۰۶).

۱-۲۵ انتقال مقاومت آنتی بیوتیکی

استفاده مداوم و غیر انتخابی از آنتی بیوتیک های موجود منجر به ازدیاد مقاومت آنتی بیوتیکی شده و وضعیت

^{۴۱} Phage-Mediated Conjugation

^{۴۲} Transduction

سخت و دشواری را برای آینده درمان عفونت باکتریایی ایجاد کرده است. مقاومت آنتی بیوتیکی هنوز یکی از نگرانی ها عمده در سلامت عمومی جهان باقی مانده است و چندین مکانیسم درگیر عناصر ژنتیکی متحرک مانند پلاسمید و ترانسپوزون ها نشان داده شده است که در گسترش وسیع و توزیع ژن های مقاومت آنتی بیوتیک بین باکتری ها نقش دارند. در سالهای اخیر، نقش ایتگرون ها به عنوان یک مکانیسم ژنتیکی سیار در انتقال افقی مقاومت آنتی بیوتیکی به خوبی آشکار شده است (۱۰۷).

۱-۲۶ عناصر سیار ژنتیکی باکتریایی^{۴۳}

عناصر سیار ژنتیکی عموماً در دو گروه قرار می گیرند، گروه اول عناصری هستند که توانایی جابه جایی از یک سلول باکتریایی به دیگر سلول باکتریایی را دارا می باشند در این گروه عناصر انتقال دهنده مقاومت آنتی بیوتیکی شامل پلاسمیدها و ترانسپوزنهای گونژکه می باشند و در دسته دیگر عناصری هستند که توانایی جابه جایی از یک منطقه ژنتیکی به یک منطقه دیگر در سلول را دارا می باشد. عناصر دوم شامل ترانسپوزون های مقاوم، کاست های ژن و ISCR^{۴۴} متحرک ژنی می باشند. پلاسمیدها و ترانسپوزون های گونژکه از طریق مکانیسمی که در همانندسازی درگیر می باشند از یک سلول به دیگر سلول منتقل می شوند. ترانسپوزون ها، کاست های ژنی و ژنهای مرتبط با ISCR بین جایگاه هایی روی یک مولکول DNA یا بین دیگر مولکول های DNA منتقل می شوند که این عمل نیازمند برخی از اشکال نو ترکیبی است که می توانند برخی از شکل های همانندسازی را در برگیرد و یا می تواند شامل چنین چیزی نشود (۱۰۸).

^{۴۳} Mobile bacterial genetic elements

^{۴۴} Insertion Sequence Common Region

کروموزوم های پروکاریوتی و یوکاریوتی حاوی قطعاتی از DNA هستند که می توانند حرکت کرده و به مکان های متفاوتی از کروموزوم مهاجرت کنند که این حرکت ترنسپوزیشن^{۳۴} خوانده می شود و نقش مهمی در تولید ترکیبات جدید ژنی بازی می کند. قطعات DNA که ژن های مورد نیاز برای جابجایی را حمل می کنند عناصر قابل انتقال یا ترانسپوزون هستند و برخی اوقات ژن های جهش دهنده نامیده می شوند. برخلاف سایر فرآیندها که موجب سازماندهی مجدد DNA می شوند فرآیند جابه جایی به نواحی همولوگی گسترده بین ترنسپوزون و محل ورود آن نیاز ندارد. ترنسپوزیشن شامل اینسرسن قطعاتی از DNA با طول معین در داخل ژنوم است پس جای تعجبی نیست که برخی اوقات منجر به غیرفعال شدن ژن ها شود. اولین و مهمترین ویژگی آنها وجود توالی های تکراری معکوس در دو سر ترانسپوزون هاست. این موضوع را به دو صورت می توان توضیح داد: یعنی توالی سر ۵' یک رشته همانند سر ۵' رشته ی دیگر است یا به عبارت دیگر یعنی سر ۵' یک رشته مکمل سر ۳' همان رشته است. تصور می شود این توالی ها در مکانیسم ورود و خروج ترانسپوزون ها به داخل ژنوم دخالت می کنند. دومین ویژگی آنها وجود ORF هایی است که آنزیمی به نام ترانسپوزاز را کد می کنند که برای جابجایی لازم است. (همه ی ترانسپوزون ها لزوماً این ناحیه را ندارند). سومین ویژگی که لزوماً در همه ی ترانسپوزون ها مشاهده نمی شود وجود ژن کدکننده (ORF) هایی است که محصولات را کد می کنند که در جابجایی نقشی ندارند، مثلاً ژن مقاومت به آنتی بیوتیک ها در باکتری ها. ترانسپوزون هایی که ویژگی دوم را ندارند برای جابجا شدن در ژنوم نیاز به وجود ترانسپوزون های دیگری روی همان کروموزوم دارند.

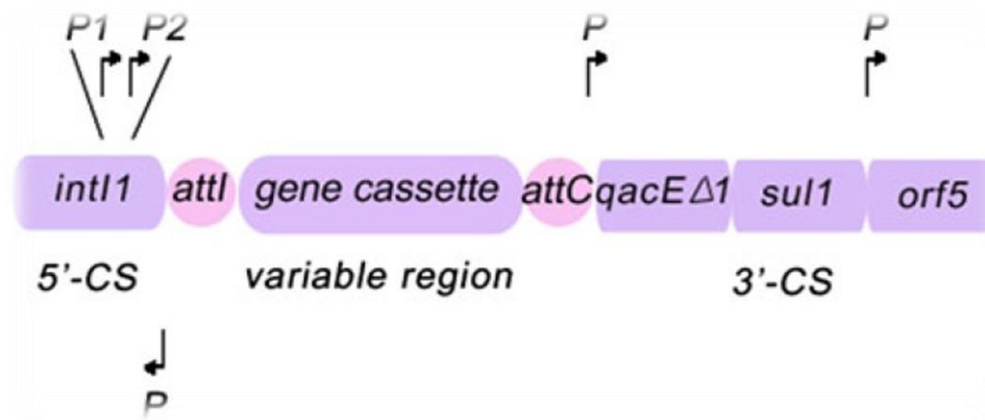
³⁴ Transposition

در ابتدا تصور می شد که انتقال ژن های مقاومتی در باکتری ها، عمدتاً از طریق کونژوگاسیون و ترانسداکشن توسط پلاسمیدها، فاژها و ترانسپوزون ها صورت می گیرد، تا در سال ۱۹۹۵ دو دانشمند به نام های Hall و Colli مکانیسم دیگری از انتقال ژن های مقاومتی را شناسایی کردند که توسط عناصری به نام ایتگرون ها انجام می شد.

۱-۲۸ ایتگرون ها

ایتگرون ها المنت های (عناصر) ژنتیکی متحرکی هستند که با قرارگیری در پلاسمیدها، کروموزوم ها و ترانسپوزون ها، ژن های مقاومتی را در حالی که در داخل کاست های ژنی خود قرار دارند حمل و جابه جا می کنند. انتقال افقی ایتگرون ها به عنوان موفق ترین راه انتشار ژن های مقاومتی و پیدایش گونه های با مقاومت چندگانه (MDR) مطرح می باشند. با توجه به این که ژن های مقاومت بر روی ایتگرون ها قرار دارند و می توانند از یک سویه به سویه دیگر منتقل می شوند، لذا این امر اهمیت شناسایی این نوع از ژن های مقاومتی را ضروری می نمایند (۱۰۹ و ۱۱۰).

یک ساختار ایتگرون عملکردی کامل سه عنصر اصلی را در بر می گیرد که شامل: ژن ایتگراز ($intI$) که کد کننده ی آنزیم ایتگراز، یک جایگاه اولیه نوترکیبی مجاور ($attI$) و یک ژن پروموتور (P_c) که از لحاظ عملکردی برای همه ایتگرون ها نشان داده می شود (۱۰۷).



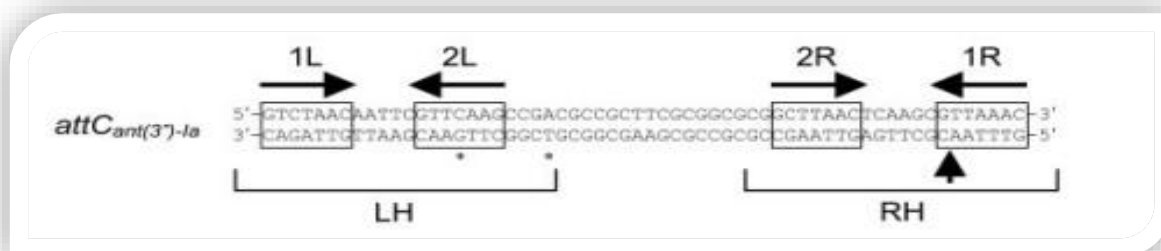
شکل ۸-۱. ساختار اینتگرون کلاس ۱

IntI یک تیروزین-کیناز خانواده اینتگراز را کد می کند که از طریق حضور آمینواسیدهای RHRH تغییر ناپذیر خود در موتیف حفاظت شده (که به عنوان باکس ۱ و باکس ۲ نیز نامگذاری می شوند) طبقه بندی می شوند که نو ترکیبی بین جایگاه attI و یک جایگاه هدف ثانویه بنام attC (که به عنوان یک عنصر ۵۹ بازی یا (59-be) شناخته می شود) را میانجی گری می کند. سایت (جایگاه) attI شامل دو توالی معکوس می باشد که به اینتگراز متصل شده است و دو جایگاه اضافی متصل شونده به اینتگراز که به ترتیب جایگاه اتصال شونده قوی (DR1) و ضعیف (DR2) نامیده می شوند که همچنین به ترتیب در ناحیه ۳۷-۲۴ و ۵۵-۴۱ جفت بازی در قسمت چپ نقطه تلاقی، قرار گرفته اند. جایگاه attC خانواده ای از توالی های متنوع را در بر می گیرد که به طور کامل حفاظت شده نیستند و به طور قابل ملاحظه در اندازه از ۵۷ تا ۱۴۱ باز اختلاف دارند. منطقه ی attC شامل ۴ جایگاه ضروری 1R, 2R و 1L, 2L نامیده می شوند، با 1R و 2R به عنوان بخش از توالی توافقی (consensus sequence) RH و 1L و 2L به عنوان بخشی از توالی توافقی LH است.

شباهت های جایگاه attC عمدتاً به مرزهایشان محدود می شوند که با جایگاه هسته معکوس (IGS)^{۳۶} مانند

³⁵inverse core site

RYYAAC و جایگاه هسته (CS) مانند GTTRRY مرتبط هستند. در واقع تمام عناصر ۵۹ بازی، دارای یک محور مرکزی متقارن در ساختار خود بوده که در دو طرف این محور تقارن، دو سایت ساده شناخته شده که به ترتیب در ICS و CS وجود داشته که جهت گیری سایت های ذکر شده در خلاف جهت یکدیگر می باشند که این مساله منجر به ایجاد ساختارهای سنجاق سری در المنت 59 جفت باز می گردد.



شکل ۹-۱. ساختار یک المنت ۵۹ جفت باز

جایگاههای attC عموماً با یک تک ORF در یک ساختار، که کاست های ژنی نامیده می شود ارتباط دارند که این ساختار لزوماً در اینتگرون ها دیده نمی شوند اما زمانی که اینتگره می شوند، بخشی از اینتگرون می شوند. این ها کوچکترین عناصر سیار ژنتیکی شناخته شده هستند که می تواند به یک یا دو شکل وجود داشته باشند که شامل مولکول DNA حلقوی غیر وابسته که در طی تقسیم سلولی ناپایدار بوده است. و فرم خطی که توسط قرارگیری (insertion) مسیر خاص بالا^{۴۷} از عنصر کروی آزاد درون اینتگرون به وجود می آید. آنها شامل یک توالی کد کننده، اما معمولاً فاقد یک پروموتور برای ساخت اجزای سیار سیستم می باشند.

به طور عمده کاست های ژنی، مقاومت در مقابل آنتی بیوتیک ها را کد می کنند و دسته ی وسیعی از آنتی

^{۴۷} Highly orientation-specific insertion

بیوتیک ها را در بر می گیرد. و امروزه بیش از ۱۰۰ کاست ژنی مقاومت آنتی بیوتیکی عمدتاً با جایگاه های attC منحصر به فرد شناسایی شدند. موقعیت یک کاست در ایتنگرون، شامل هم ترتیب و هم فاصله می باشد که دقیقاً با سطح مقاومت آنتی بیوتیکی مرتبط می باشد. قرار گرفتن کاست ژنی در جایگاه attI، که در پایین دست یک پروموتور ساکن داخلی ژن intI قرار دارد، صورت می گیرد که بیان پروتئین های کد شده را هدایت می کند. در ایتنگرون کلاس ۱، کاست های ژنی از یک پروموتور مشترک بیان می شوند، که این پروموتور در بخشی از منطقه ی حفاظت شده CS^۵ وجود دارد جایی که در آنجا دو پروموتور بالقوه PC و P2 قرار دارند. PC همچنین به عنوان یک PANT، در طرف بالادست ۲۰۰ جفت بازی جایگاه ایتنگره قرار گرفته است. و P2 که اخیراً در ایتنگرون های کلاس ۱ شناسایی شده که در بیان کاست های ژنی نیز موثر می باشد این پروموتور در ۱۱۹ جفت بازی پایین دست پروموتور PC قرار دارد و متغایب افزایش سه باز گوانین (G) در بین ناحیه ۱۰- و ۳۵- ایجاد می گردد، در نتیجه نوکلئوتیدهای موجود در بین این ناحیه از ۱۴ نوکلئوتید به ۱۷ نوکلئوتید افزایش می یابد. این پروموتور زمانی شروع به فعالیت می کند که پروموتور PC به درستی فعالیت نکند در این مواقع مسئول ۹۰٪ از کل فعالیت بیان کاست ها را بر عهده دارد. هر چند این پروموتور نه به عنوان بخشی از سایت اختصاصی نوترکیب، اما نقش کلیدی در عملکرد ایتنگرون دارد به نحوی که بیان صحیح از کاست ژن را تضمین می کند. بخش حفاظت شده ۳' (CS-3') ایتنگرون کلاس ۱ دارای ژن های qacEΔ1 و sul1 که به ترتیب کد کننده مقاومت به نمک های چهار ظرفیتی آمونیوم و سولفانامید می باشند (۱۰۷).

چندین کلاس از ایتنگرون شناسایی شدند و بر اساس تفاوت و واگرایی در توالی intI تشخیص داده می شوند، و کلاس های ایتنگرونی ۱-۳ اصطلاحاً ایتنگرون چندگانه مقاومت نامیده می شوند (RIs)^{۴۸} که به ظاهر توانایی

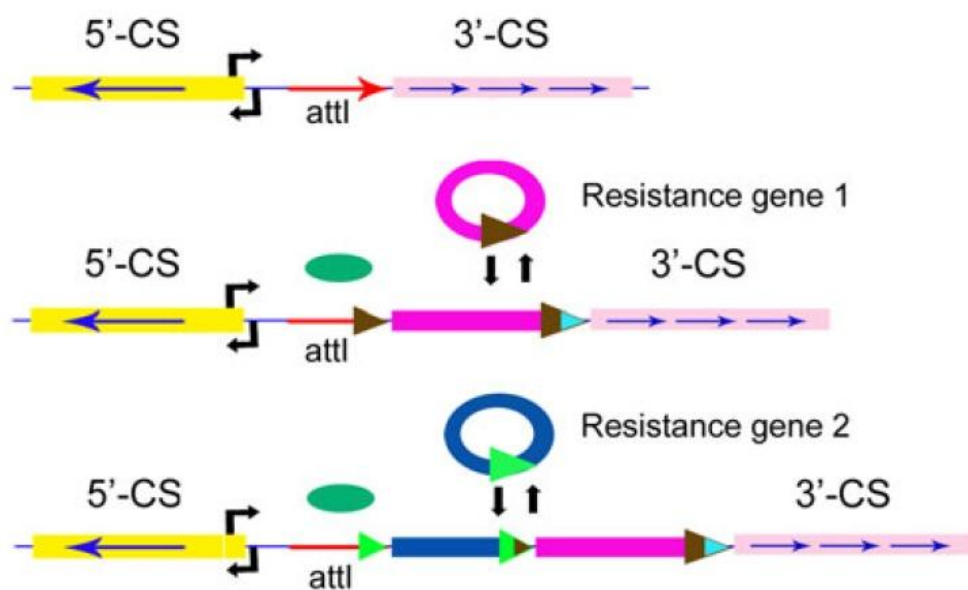
^{۴۸} Resistant integrons

کسب کاست های ژنی یکسانی را دارا می باشند. اینتگرون کلاس ۴ نوع متفاوتی دیگر از اینتگرون ها در نظر گرفته می شود که به عنوان یک سوپراینتگرون (SI) شناخته می شود که بر روی کروموزوم کوچک ویبریو کلا/ یافت شد و همچنین به عنوان یکی از اجزای داخلی ژنوم گاما پروتئوباکتریال شناخته می شود. به طور تقریبی ۹٪ از توالی ژنوم باکتریایی در برگیرنده اینتگرون های می باشد که از بین اینها، اینتگرون کلاس ۱ در بین باکتری های پاتوژن فراگیرترین می باشد و مطالعات صورت گرفته در این باره با تمرکز بیشتری بر روی این نوع کلاس باقی مانده است. در نتیجه پیوند مستقیم اینتگرون های کلاس ۱ با ترانسپوزون های مانند Tn402، اینتگرون مرتبط با خانواده ترانسپوزون Tn3 گزارش شده است (Tn21 یا Tn1696). اینتگرون کلاس ۱ در دسته وسیعی از باکتری های گرم منفی شامل اسیتوباکتر، ائروموناس، آلکازینز، بورخولدريا، کمپیلوباکتر، سیتروباکتر، انتروباکتر، اشرشیا، کلبسیلا، مایکوباکتریوم، سودوموناس، سالمونلا، سراشیا، شگیلا و ویبریو و همچنین در تعداد کمی از باکتری های گرم مثبت گزارش شده است. **اینتگرون کلاس ۲** سازمان مشابه ای به اینتگرون کلاس ۱ دارد اما با خانواده ترانسپوزون Tn7 مرتبط می باشد. اینتگرون کلاس ۲ سه کاست ژنی اختصاصی را حمل می کند که شامل sat1، dfrA1 و aadA1 که به ترتیب مقاومت به تری متوپریم، استرپتوتریسین و استرپتومایسین/ اسپکتینومایسین را سبب می شوند. بنابراین اینتگرون کلاس ۲ به عنوان عامل شرکت کننده در موضوع مقاومت آنتی بیوتیک در نظر گرفته می شود و عموماً در برخی گونه ها از ارگانیسم های گرم منفی مانند اسیتوباکتر، انتروباکتریاسه، سالمونلا و سودوموناس دیده شده است. IntI2 قادر به برش جایگاه خاص و قراردادن کاست های ژن به طور دقیق درون attI2 می باشد. اما با وجود کاست های ژنی مشابه یافت شده هم در اینتگرون های کلاس ۱ و ۲، این اینتگراز قادر به شناسایی کاست های ژنی از اینتگرون کلاس ۱ نمی باشد. جایگاه نو ترکیب attI2 و پروموتور Pc درون ترانسپوزون هایی مانند Tn7، و 3'-CS دارای ۵ ژن tns درگیر در جابه جایی

ترانسپوزون هستند که حرکت اینتگرون کلاس ۲ را از طریق یک قرارگیری ماهرانه به یک جایگاه خاص درون کروموزوم های باکتری میانجه گیری می کند. **اینتگرون کلاس ۳** شامل یک ساختار قابل قیاس با اینتگرون کلاس ۲ می باشد و تا امروز در سودوموناس، آکالیژنز، *سراشیا مارسنس* و *کلبسیلا پنومونیه* شرح داده شده است. **IntI1** و **IntI3** هر دو بخشی از گروه پروتئوباکتری های آب های شیرین و خاک می باشند، در حالی که اینتگرون های کلاس ۲ درون گروه های گاما پروتئوباکتری ها هستند. شباهت ساختاری آن به **IntI1**، **IntI3** قادر است جایگاه های مختلف **attC** را شناسایی کند و کاست ها را درون جایگاه **attI3** قرار دهد. اینتگرون کلاس ۴ صدها کاست ژنی را بر روی خود حمل می کند که آنها کد کننده ی نسخه هایی مقاومت آنتی بیوتیکی و بیماریزایی را گسترش می دهد در ایزوله هایی از قرن اخیر پیدا شده است و حضور آنها قبل از عصر آنتی بیوتیک ها نشان داده شده است. دو ویژگی کلیدی که اینتگرون کلاس ۴ را تعریف می کند و از دیگر **RI**s ها تمایز می دهد این است که : ۱) تعداد زیادی از کاست هایی که در نمونه مانند *ویبریوکلرا* قرار گرفته اند، خوشه **VCR** مرتبط با **ORFs** حداقل ۲۱۶ ژن غیرشناسایی شده را در یک دسته از ۱۷۹ کاست نشان می دهد که ۳٪ از ژنوم را اشغال کرده اند. ۲) همسانی بالا بین جایگاه های **attC** از آن کاست های تجمع یافته. اینتگرون کلاس ۴ بین *ویبریوناسه*، *شوانلا*، *زانتاموناس*، *سودوموناس* همانند دیگر پروتئوباکتری ها شناسایی و طبقه بندی شده است. بقیه کلاس های اینتگرونی همچنین ممکن است دارای کاست های ژنی مقاومت به آنتی بیوتیک باشند اما شیوع جهانی آنها به صورت کمی باقی مانده است.

ساختارهای اینتگرونی برای انتقال خودی ناقص هستند اما ترانسپوزون ها و پلاسمیدهای کونژگه مرتبط می توانند به عنوان وسیله ای برای انتقال مواد ژنتیکی به درون و بیرون گونه ها عمل کنند. واکنش جایگاه اختصاصی نو ترکیبی می تواند از طریق اینتگراز **Tn21** یا اینتگراز اینتگرون **IntI1** واسطه گری کند زمانی که سایت های

اینتگریشن به ترتیب توالی توافقی GWTMW یا GNT را تطابق بدهند. IntI1 سه نوع از جایگاه های نوترکیبی از جمله attI1، attC و سایت های ثانوی را شناسایی می کند. وقوع نوترکیبی بین جایگاه attI1 و attC کمی موثرتر از جایگاه های بین دو attC می باشد. اما آنها بین دو جایگاه attI1 بسیار کمتر است. برای جایگاه های ثانویه، نوترکیبی با attC موثرتر از attI می باشد.



شکل ۱-۱۰. مکانیسم اینتگرون کلاس ۱ مرتبط با برش (excision) و جایگزینی (integration)

جدول ۵-۱ کاست های ژنی ایتگرون مسئول کد کننده ی شاخص های مقاومت آنتی بیوتیک (۱۰۹).

Gene cassette ^b	Protein ^c	Activity	Accession No. ^d
Resistance to beta-lactams			
<i>blaP1</i>	CARB-2 (PSE-1), CARB-3, PSE-4	beta-lactamase	Z18955
<i>blaP2</i>		beta-lactamase	D13210
<i>blaP3</i>	CARB-4	beta-lactamase	U14749
<i>blaIBC-1</i>	IBC-1	beta-lactamase	AF208529
<i>blaIMP</i>	IMP	beta-lactamase	D50438
<i>BlaIMP-7</i>	IMP-7	beta-lactamase	AF318077
<i>BlaIMP-9</i>	IMP-9	beta-lactamase	AY033653
<i>blaCEF-1</i>		beta-lactamase	AF078527
<i>blaVEB-1</i>	VEB-1	beta-lactamase	AF205943
<i>blaVIM-1</i>	VIM-1	beta-lactamase	Y18050
<i>blaVIM-2</i>	VIM-2	beta-lactamase	AF191564
<i>oxa1</i>	OXA-1, OXA-8, OXA-4	beta-lactamase	J02967
<i>oxa2a (oxa2b)</i>	OXA-2, OXA-15, (OXA-32)	beta-lactamase	M95287
<i>oxa3</i>	OXA-3	beta-lactamase	L07945
<i>oxa5</i>	OXA-5	beta-lactamase	X58272
<i>oxa7</i>	OXA-7	beta-lactamase	X75562
<i>oxa9</i>	OXA-9	beta-lactamase	M55547
<i>oxa10</i>	OXA-10 (PSE-2), OXA-11, OXA-14	beta-lactamase	U37105
<i>oxa20</i>	OXA-20	beta-lactamase	AF024602
<i>oxa28</i>	OXA-28	beta-lactamase	AF231133
Resistance to aminoglycosides: to streptomycin and spectinomycin			
<i>aadA1a</i>	AAD(3'')	aminoglycoside (3'') adenyltransferase	X12870
<i>aadA1b</i>	AAD(3'')	aminoglycoside (3'') adenyltransferase	M95287
<i>aadA2</i>	AAD(3'')	aminoglycoside (3'') adenyltransferase	X68227
<i>aadA3</i>	AAD(3'')	aminoglycoside (3'') adenyltransferase	AF047479
<i>aadA4</i>	AAD(3'')	aminoglycoside (3'') adenyltransferase	Z50802
<i>aadA5</i>	AAD(3'')	aminoglycoside (3'') adenyltransferase	AF137361
<i>aadA6</i>	AAD(3'')	aminoglycoside (3'') adenyltransferase	AF140629
<i>aadA7</i>	AAD(3'')	aminoglycoside (3'') adenyltransferase	AF224733
<i>aadA8</i>	AAD(3'')	aminoglycoside (3'') adenyltransferase	AF326210

Gene cassette ^b	Protein ^c	Activity	Accession No. ^d
To other aminoglycosides			
<i>aadB</i>	AAD(2'')	aminoglycoside (2'') adenylyltransferase	L06418
<i>aacA1</i>	AAC(6')-Ia	aminoglycoside (6') acetyltransferase	M18967
<i>aacA</i>	AAC(6')-Ip	aminoglycoside (6') acetyltransferase	Z54241
<i>aacA</i>	AAC(6')-Iq	aminoglycoside (6') acetyltransferase	AF047556
<i>aacA4</i>	AAC(6')-Ib, AAC(6')-Ilc	aminoglycoside (6') acetyltransferase	M55547
<i>aacA</i>	AAC(6')-IIa	aminoglycoside (6') acetyltransferase	M29695
<i>aacA</i>	AAC(6')-IIb	aminoglycoside (6') acetyltransferase	L06163
<i>aacA (orfB)</i>	AAC(6')-Id	aminoglycoside (6') acetyltransferase	X12618
<i>aacA7</i>	AAC(6')-II	aminoglycoside (6') acetyltransferase	U13880
<i>aacC1</i>	AAC(3')-Ia	aminoglycoside (3') acetyltransferase	X15852
<i>aacC</i>	AAC(3')-Ib	aminoglycoside (3') acetyltransferase	L06157
<i>aphA15</i>	APH(3')-II	aminoglycoside (3') phosphotransferase	AJ278514
Resistance to chloramphenicol			
<i>cat</i>	CAT	chloramphenicol acetyltransferase	X82455
<i>cat</i>	CAT	chloramphenicol acetyltransferase	X98393
<i>catB2</i>	CATB2	chloramphenicol acetyltransferase	AF047479
<i>catB3</i>	CATB3	chloramphenicol acetyltransferase	U13880, AJ009818
<i>catB4</i>	CATB4	chloramphenicol acetyltransferase	AF322577
<i>catB6</i>	CATB6	chloramphenicol acetyltransferase	AJ223604
<i>catB8</i>	CATB6	chloramphenicol acetyltransferase	AF227506
<i>catB9</i>	CATB9	chloramphenicol acetyltransferase	AF462019
<i>cmlA</i>	CmlA	chloramphenicol exporter	U12338
<i>cmlA2</i>	CmlA2	chloramphenicol exporter	AF034958
<i>CmlA4</i>	CmlA4	chloramphenicol exporter	AF156486
<i>cmlA5</i>	CmlA5	chloramphenicol exporter	AF205943
Resistance to trimethoprim			
<i>dfrA1</i>	DHFRla	dihydrofolate reductase (classA)	X00926
<i>dfrA5</i>	DHFRV	dihydrofolate reductase (classA)	X12868
<i>dfrA6</i>	DHFRVI	dihydrofolate reductase (classA)	Z86002
<i>dfrA7</i>	DHFRVII	dihydrofolate reductase (classA)	X58425
<i>dfrA12</i>	DHFRXII	dihydrofolate reductase (classA)	Z21672
<i>dfrA13</i>	DHFRXIII	dihydrofolate reductase (classA)	Z50802
<i>dfrA14</i>	DHFRlib	dihydrofolate reductase (classA)	S76821
<i>dfrA15</i>	DHFRXV	dihydrofolate reductase (classA)	Z83311
<i>dfrA16</i>	DHFRXVI	dihydrofolate reductase (classA)	AF077008
<i>dfrA17</i>	DHFRXVI	dihydrofolate reductase (classA)	AF169041
<i>dfrB1</i>	DHFRIIa	dihydrofolate reductase (classB)	U36276
<i>dfrB2</i>	DHFRIIb	dihydrofolate reductase (classB)	J01773
<i>dfrB3</i>	DHFRIIc	dihydrofolate reductase (classB)	X72585
Resistance to streptothricin			
<i>sat</i>	SAT-2	streptothricin acetyltransferase	X15995
Resistance to rifampin			
<i>arr2 (arr-3)</i>	ARR-2 (ARR-3)	ADP-ribosyl transferase	AF078527, AY038837
Resistance to erythromycin			
<i>ereA</i>	EreA	erythromycin esterase	L. Biskri and D. Mazel
<i>ereA2</i>	EreA2	erythromycin esterase	AF099140
Resistance to antiseptics and disinfectants			
<i>qacE</i>	QacE	quaternary ammonium compound exporter	X72585
<i>qacE2</i>	QacE2	quaternary ammonium compound exporter	AJ223604
<i>qacF</i>	QacF	quaternary ammonium compound exporter	AF034958
<i>qacH</i>	QacH	quaternary ammonium compound exporter	AF205943
<i>smr^e</i>		probable multi-drug exporter	AF406792

استافیلوکوکوس/اورئوس انگل اجباری انسان است. منابع عفونت به طور عمده شامل انتشار باکتری از زخم ها ، ترشحات آلوده زخم ها ، دستگاه تنفسی و پوست می باشد. انتشار تماسی عفونت اهمیت خاصی در بیمارستان ها دارد ، چرا که تعداد زیادی از کارکنان بیمارستان و بیماران استافیلوکوک های مقاوم به آنتی بیوتیک را در بینی یا پوست خود حمل می کنند. اگرچه نظافت، بهداشت و تمیز نمودن زخم ها می تواند در کنترل انتشار استافیلوکوکوس/اورئوس از زخم ها موثر باشد ، اما روش های مقابله با انتشار عفونت در حاملین بسیار محدود است (۱۱۱ و ۱۱۲).

اُروسل هایی نظیر گلیکول ها و اشعه ماورابنفش ، تاثیر کمی در استریل نمودن دارند. در بیمارستان ها بخش هایی مانند بخش اطفال ، بخش مراقبت های ویژه (ICU) ، اتاق های جراحی و قسمت شیمی درمانی سرطان خطر بالایی برای عفونت های استافیلوکوکوس/اورئوس دارند. در حالت کلی ورود استافیلوکوکوس/اورئوس های پاتوژن به این قسمت ها ممکن است موجب عفونت های شدید گردد (۱۱۳). کارکنان بیمارستان که به صورت حامل یا دارای زخم های استافیلوکوکوس/اورئوس هستند، می بایستی از ورود به بخش های فوق خودداری کنند. در چنین افرادی استفاده از آنتی سبتیک های موضعی در ناحیه بینی یا پرینه ممکن است موجب کاهش انتشار ارگانیسم های خطرناک گردد. ریفامپین و موپیروسین گاهی موجب درمان ناقلین می شود. اما از این روش درمانی در موارد خاص که عفونت مشکلات متعددی را ایجاد می کند، استفاده می کنند ، زیرا استافیلوکوکوس/اورئوس به سرعت نسبت به آنتی بیوتیک های فوق مقاوم می شود (۸۰).

برای کاهش انتقال عفونت در بیمارستان ها و بیماران در معرض خطر (مانند بیمارانی که در بخش های ICU و سایر بخش های پرخطر هستند، می بایستی بیماران از نظر کلینزاسیون باکتری در ناحیه بینی مورد بررسی قرار

گیرند. در بیمارانی که کشت یا PCR مثبت دارند، می بایست احتیاط لازم را انجام داد تا انتقال عفونت به کارکنان سالم به حداقل برسد. کارکنان بیمارستان می توانند با اقدامات بهداشتی نظیر پوشیدن دستکش و شستشوی دست ها قبل و بعد از تماس با بیماران، نقش مهمی را در کنترل عفونت داشته باشند (۱۱۴ و ۱۱۵).

۳۰-۱ درمان

بسیاری از افراد حامل /استافیلوکوکوس/اورئوس بر روی پوست یا بینی یا گلوئی خود هستند. در صورتی که پوست از استافیلوکوک پاک شود، (مانند آگزما) عفونت از طریق ائروسول به سرعت جایگزین می شود. به دلیل اینکه ارگانیسم های پاتوژن به راحتی از یک ضایعه مانند کورک به وسیله انگشتان و حتی لباس ها به سایر قسمت ها منتقل می شود، ضد عفونی کردن موضعی اهمیت خاصی در کنترل کورک های عودکننده دارد (۵۰).

عفونت های شدید پوستی (مانند آکنه و کورک)، اغلب در بالغین دیده می شود. عفونت های پوستی مشابهی در بیمارانی که به مدت طولانی تحت درمان با کورتیکواستروئیدها هستند دیده می شود. در موارد آکنه، /استافیلوکوکوس/اورئوس و کورینه باکترها، اسیدهای چرب را از لیپیدها جدا کرده، در نتیجه موجب آسیب و تخریب بافتی می شوند. در این موارد برای درمان از تتراسایکلین به مدت طولانی مدت استفاده می شود (۱۴).

آبسه ها و سایر ضایعات بسته چرک دار را می توان با تخلیه ضایعات و درمان آنتی بیوتیکی ریشه کن نمود. آنتی بیوتیک های متعددی در آزمایشگاه بر روی /استافیلوکوکوس/اورئوس موثر است از جمله پنی سیلین و تتراسایکلین، اما به دلیل اینکه ارگانیسم ها به سرعت نسبت به آنتی بیوتیک ها مقاوم می شوند و از طرف دیگر داروها توانایی نفوذ به قسمت مرکزی ضایعات نکروزه را ندارند، ریشه کنی این عفونت ها مشکل است. ریشه کنی /استافیلوکوکوس/اورئوس از ناقلین نیز بسیار مشکل است (۱۴).

معمولاً استئومیلیت حاد با منشا خونی به درمان ضد میکروبی بتا لاکتام ها خوب جواب می دهد. در استئومیلیت های مزمن و عود شونده ، جراحی و برداشت بافت مرده استخوان به همراه استفاده طولانی مدت از داروهای ضد میکروبی مانند ونکومایسن تجویز می شود. استفاده از اکسیژن با فشار بالا و پیوند پوستی عضلانی در بهبود استئومیلیت های مزمن کمک کننده است (۱۴ و ۴۹).

عفونت هایی مانند باکتری می ، اندوکاردیت ، پنومونی و سایر عفونت های شدید ایجاد شده توسط *استافیلوکوکوس/اورئوس* را بایستی به وسیله تجویز داخل وریدی پنی سیلین های مقاوم به بتالاکتاماز درمان نمود. معمولاً از ونکومایسن در مواردی که باکتری به نفسیلین مقاوم باشد استفاده می شود. لذا در درمان سویه های MRSA استفاده از ونکومایسن از اهمیت ویژه ای برخوردار است (۱۱۵). در سال های اخیر افزایشی در حداقل غلظت مهاری (MIC) ونکومایسن در میان سویه های MRSA جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان دیده شده که سبب گردیده پزشکان به دنبال درمان جایگزین دیگری باشند. درمان جایگزین باکتری می و اندوکاردیت ناشی از MRSA شامل آنتی بیوتیک هایی همچون داپتومایسن ، لینزولید و کوئینوپرسیتین - دالفوپرسیتین است. در صورتی که مشخص شود عفونت از طریق *استافیلوکوکوس/اورئوس* حساس به β -لاکتاماز صورت می پذیرد ، پنی سیلین G اولین داروی انتخابی است ، ولی این سویه ها بندرت دیده می شوند (۱۱۶ و ۱۱۷). با توجه به فراوانی بالای سویه های مقاوم به دارو، تمام سویه های *استافیلوکوکوس/اورئوس* جدا شده باید از نظر حساسیت آنتی بیوتیکی مورد بررسی قرار گیرند تا داروی مناسب برای درمان آن ها انتخاب شود. به دلیل اینکه مقاومت در برابر داروهای گروه اریترومایسین به سرعت ایجاد می شود، این داروها نباید به تنهایی برای درمان عفونت های مزمن استفاده شوند. شاخص های مقاومت آنتی بیوتیکی از طریق ترانسداکشن و یا احتمالاً کانژوکاسیون در بین استافیلوکوک ها منتقل می شود (۱۴).



بخش دوم

مروری بر مطالعات

۱-۲ بررسی متون

▪ سید جوادی و همکاران طی مطالعه ای در تهران در سال ۲۰۱۴ بر روی ۴۱۰ نمونه بالینی، محیطی و پرسنل بخش ICU نشان دادند. که از این تعداد، ۱۰۵ نمونه بالینی ۳۴ (۳۲/۳٪) نمونه، از ۱۲۴ نمونه پرسنل ۲۴ (۱۹/۳٪) نمونه و از ۱۸۱ نمونه محیطی ۴۹ (۲۷٪) نمونه از نظر *استافیلوکوکوس اورئوس* مثبت بودند که مجموعاً از ۴۱۰ نمونه جدا شده، ۱۰۸ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شد. تمام ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه های بالینی و ۳۳/۳٪ ایزوله های به دست آمده از نمونه های محیطی دارای فنوتیپ MDR بودند. و در ادامه مطالعه از مجموع ۱۰۸ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۳۱ (۲۸/۷٪) ایزوله از نظر ژن اینتگرون کلاس ۱ مثبت بودند. از مجموع ۳۱ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* که از نظر اینتگرون مثبت بودند ۲۶ (۸۳/۸٪) سویه مقاوم به متی سیلین بودند (۱۱۸).

▪ طی مطالعه ای که پرستو ویسه و همکاران در سال ۲۰۱۳ در ایران بر روی ۲۰۰ ایزوله *استافیلوکوکوس* جدا شده از بیمارستان های شهر سنج در استان کردستان انجام دادند: که ۸۱ (۴۰/۵٪) ایزوله از مجموع آنها دارای ژن اینتگرون کلاس ۱ بودند که به ترتیب ۳۵ (۲۳/۹٪) ایزوله *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، ۳۷ (۴۰/۱٪) ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* و ۹ (۳۶٪) *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس*، دارای ژن اینتگرون کلاس ۱ بودند (۱۱۹).

▪ ماراته و همکاران در سال ۲۰۱۴ در کشور هند توانستند ۱۴۳ ایزوله MRSA را از دو بیمارستان واقع در دو شهر مختلف جمع آوری کنند و آنها را از لحاظ حضور ژن اینتگرون کلاس ۱ مورد بررسی قرار

دهند. که از این تعداد ۷۱٪ ایزوله ها دارای این ژن بودند. و از بین آنها ۳۹٪ آنها در بخش ۳^۴ اینتگرون خود دارای بخش *sul1/qacEΔ1* بودند (۱۲۰).

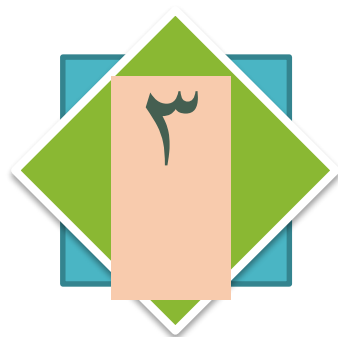
■ در مطالعه ای که توسط Xu و همکارانش طی سال های ۲۰۰۶-۲۰۰۱ در کشور چین انجام گرفت. از بین ۱۷۹ ایزوله /ستافیلوکوکوس/ورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA)، ۷۶ (۴۲/۵٪) از آنها دارای اینتگرون کلاس ۱ بودند (۱۲۱).

■ در مطالعه ی دیگری که توسط Xu و همکارانش در سال ۲۰۰۷ در چین انجام گرفت. از بین ۳۰ ایزوله /ستافیلوکوکوس/ورئوس از بیماران و محیط بخش جراحی، ۱۶ (۵۳٪) ایزوله دارای ژن اینتگرون کلاس ۱ بودند (۱۲۲).

■ در مطالعه ای که Ren و همکارانش در سال ۲۰۱۳ در چین بر روی ۱۸۰ ایزوله بیمارستانی /ستافیلوکوکوس/ورئوس انجام دادند، ۹۲ (۵۱/۱۱٪) و ۷۱ (۳۹/۴۴٪) ایزوله آنها به ترتیب دارای اینتگرون کلاس ۱ با منشاء DNA پلاسمیدی و DNA کروموزومی بودند. و در ادامه کار به منظور بررسی حضور ژن اینتگرون کلاس ۲، ۲۳ (۱۲/۷۸٪) و ۱۰ (۵/۸۸٪) ایزوله از مجموع ۱۸۰ به ترتیب دارای این کلاس اینتگرونی یا منشأ پلاسمیدی و کروموزومی بودند (۱۲۳).

■ Liu و همکاران در سال ۲۰۱۳ در چین مطالعه ای رو بر روی ۷۴۳ پاتوژن فرصت طلب جدا شده از مجاری تنفسی فوقانی انجام دادند که از این میان تعداد، ۴۰۴ ایزوله استافیلوکوکوس کواکولاز منفی و ۱۰۹ ایزوله /ستافیلوکوکوس/ورئوس بودند، و پس از PCR ژن اینتگرون کلاس ۱ تمام استافیلوکوکوس کواکولاز منفی و مثبت از نظر این ژن منفی بودند (۱۲۴).

▪ در طی سال های ۲۰۰۳ تا ۲۰۰۴ آقای Xu و همکارانش توانستند ایتتگرون کلاس ۱ را در بین ۸ ایزوله از ۱۰ ایزوله ی انتروکوک شناسایی کنند. که از بین این ۸ ایزوله مثبت، دو ایزوله هم زمان دارای ژن ایتتگرون کلاس ۲ نیز بودند (۱۲۵).



بخش سوم

مواد و روش‌ها

۳-۱ اهداف و فرضیات

۳-۱-۱ هدف اصلی^{۴۹}

- تعیین فراوانی مقاومت دارویی چندگانه و ایتنگرون های کلاس های ۱، ۲ و ۳ در ایزوله های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان های آموزشی

۳-۱-۲ اهداف فرعی^{۵۰}

- تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی گونه های *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به دیسک های جنتامایسین، آمیکاسین، توبرامایسین، ریغامپیسین، پنی سیلین، اگزاسیلین، سیپروفلوکساسین، لووفلوکساسین، موکسی فلوکساسین، تری متوپریم-سولفامتوکسازول، تیکوپلانین، کلیندامایسین، اریترومایسین، لینوزولید، کلرامفنیکل و تتراسیکلین به روش دیسک آگار دیفیوژن مطابق با روش استاندارد پیشنهادی CLSI بر اساس نوع نمونه کلینیکی، بخش، بیمارستان و شهر
- تعیین سویه های دارای الگوی مقاومت دارویی چندگانه (MDR)
- تعیین فراوانی ژنوتیپ های کلاس های ایتنگرونی ۱، ۲ و ۳ در ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* بر اساس نوع نمونه کلینیکی، بخش، بیمارستان و شهر
- تعیین فراوانی ژنوتیپ های کلاس های ایتنگرونی ۱، ۲ و ۳ در ایزوله های MDR
- تعیین فراوانی ژنوتیپ های کلاس های ایتنگرونی ۱، ۲ و ۳ در ایزوله های MRSA
- تعیین پروفایل حساسیت آنتی بیوتیکی در بین ایزوله های دارای کلاس ایتنگرونی

^{۴۹} General Objective

^{۵۰} Specific Objectives

۳-۱-۳ اهداف کاربردی^{۵۱}

از آنجایی که الگوی مقاومت دارویی دارای توزیع جغرافیایی، منطقه ای و حتی بیمارستانی می باشد. لذا تعیین الگوی مقاومتی سویه های استافیلوکوکی جدا شده از عفونت های بیمارستانی به روش فنوتیپی و تعیین فاکتور های ژنتیکی آن در این سویه ها می تواند در تعیین رژیم درمانی مناسب برای بیماران و ارایه نتایج آن به کمیته های کنترل عفونت بیمارستان ها از جهت کنترل سویه های دارای مقاومت چندگانه و همچنین بررسی های اپیدمیولوژیک موثر باشد.

۳-۱-۴ فرضیه یا سوال های پژوهش

- فراوانی مقاومت به کلاس های مختلف آنتی بیوتیکی در بین سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه های بیماران بستری چگونه است؟
- فراوانی ژن *IntI 1* در بین سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه های بیماران بستری چگونه است؟
- فراوانی ژن *IntI 2* در بین سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه های بیماران بستری چگونه است؟
- فراوانی ژن *IntI 3* در بین سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه های بیماران بستری چگونه است؟
- فراوانی کلاس های ایتگرونی ۱، ۲ و ۳ در بین سویه های استافیلوکوکوس اورئوس دارای مقاومت دارویی چندگانه و مقاوم به متی سیلین به چه صورت می باشد؟

^{۵۱} Applied Objectives

۲-۳ مواد و روش ها

۱-۲-۳ نوع مطالعه : اپیدمیولوژیک مولکولی - توصیفی

۲-۲-۳ معیارهای خروج از مطالعه: تمامی نمونه های بیماران سرپایی و تکراری از جامعه مورد مطالعه حذف

گردیدند. و وارد مطالعه نشدند.

۳-۲-۳ جامعه مورد مطالعه، روش محاسبه و نمونه گیری

جامعه ی مورد مطالعه، شامل کلیه سویه های /استافیلوکوکوس/اورئوس بود که از نمونه های بالینی بیماران بستری شده در بیمارستان های آموزشی قزوین (کوثر، بوعلی، قدس و شهید رجایی) و بیمارستان امام حسین تهران جداسازی شد. برای تعیین حجم نمونه بر اساس پارامترهای آماری مطالعه از فرمول زیر استفاده گردید. روش نمونه گیری بر اساس شرایط مطالعه و محدودیت منابع به صورت نمونه گیری آسان و به طور تصادفی انجام شد.

مقدار حجم نمونه تقریباً برابر با ۲۲۴ محاسبه شد که با ۶ عدد ریزش برابر با ۲۳۰ نمونه می باشد و این عدد با توجه به میانگین شیوع ۳۰ درصدی زن ایتگراز و ضریب اطمینان ۹۵ درصد و دقت ۶ درصد به دست آمد. بر این اساس تعداد نمونه ۲۲۴ برآورد گردید که عملاً ۲۳۰ نمونه وارد مطالعه شد.

$$n = \frac{Z_{1-\frac{\alpha}{2}}^2 \times P \times (1 - P)}{d^2} = 224 + 6 = 230$$

$$p = 0/25, d = 0/06, 1 - \alpha = 0/95$$

جدول ۳-۱. جدول متغیرهای مطالعه

عنوان متغیر	مستقل	وابسته	کمی		کیفی		تعریف علمی	مقیاس
			پیوسته	گسسته	اسمی	رتبه ای		
نوع نمونه کلینیکی	*				*		براساس نوع نمونه ایی که سویه استافیلوکوک / اورئوس از آن جدا می شود	
نوع بیمارستان					*		۴ بیمارستان آموزشی قزوین و ۲ بیمارستان تهران	
مقاومت به دیسک های آنتی بیوتیک انتخاب شده					*		براساس نتایج دیسک دیفیوژن و اندازه منطقه عدم رشد و مطابقت با جداول CLSI	حساس / حد واسط / مقاوم
حضور ژن های اینتگرون های کلاس های ۱، ۲ و ۳					*		براساس نتایج PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی هر ژن	دارد / ندارد

۳-۳ جمع آوری نمونه

در این مطالعه کلیه ی نمونه های ارسالی از بیماران بستری در بیمارستان های آموزشی شهرهای قزوین و تهران

به آزمایشگاه های بیمارستان که *استافیلوکوکوس اورئوس* تشخیص داده شد ، مورد بررسی قرار گرفت .

نمونه ها از آزمایشگاه های تشخیصی بیمارستان های آموزشی قزوین شامل کوثر (زنان)، شهید رجایی (سوانح و جراحی)، بوعلی (داخلی) و قدس (کودکان) و بیمارستان امام حسین تهران (داخلی ۶۰۰ تختخوابی) به مدت ۱۱ ماه جمع آوری شدند. هم چنین اطلاعات دموگرافیک و بالینی بیماران از پرونده ی پزشکی آنان جمع آوری گردید.

۳-۴ آزمایش های تعیین هویت ایزوله ها به روش های فنوتیپی

کلیه نمونه ها ابتدا به منظور حصول اطمینان از خالص بودن، در محیط نوترینت آگار تجدید کشت و ایزوله شدند. پس از آن به منظور تعیین هویت قطعی و تشخیص ایزوله ها، از آزمایشات زیر استفاده گردید.

۱- رنگ آمیزی گرم برای مشاهده مورفولوژی باکتری ها

۲- آزمایش کاتالاز

۳- آزمایش DNase

۴- کواگولاز لام و لوله ای

۵- رشد بر روی مانیتول سالت آگار

۶- انجام آزمایش PCR جهت ژن *femA* جهت تایید گونه های *استافیلوکوکوس اورئوس*

کلیه سویه های گرم مثبت، کاتالاز مثبت، کواگولاز مثبت، DNase مثبت که بر روی مانیتول سالت آگار رشد می کردند و دارای ژن *femA* بودند به عنوان گونه *استافیلوکوکوس اورئوس* در نظر گرفته می شدند.

مواد و وسایل موردنیاز:

۱. کیت رنگ آمیزی گرم

۲. آب اکسیژنه ۳٪

۴. سرم فیزیولوژی

۵. پلاسمای خرگوش

۶. محیط کشت مانیتول سالت آگار

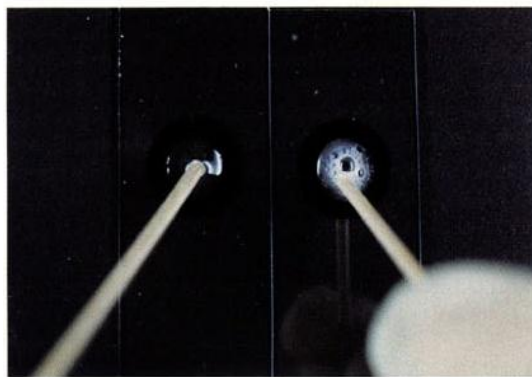
۷. محیط کشت DNase

۸. اسیدکلریدریک

۹. لام و لوپ

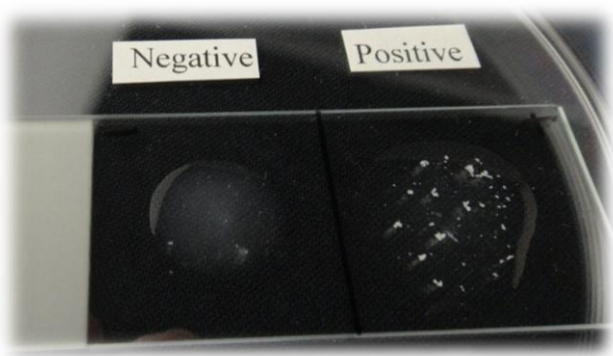
روش کار:

- رنگ آمیزی گرم: با کمک رنگ آمیزی گرم تمامی کوکسی های گرم مثبت جداسازی شدند.
- آزمایش کاتالاز: جهت انجام این آزمایش، ابتدا H_2O_2 ۳۰٪ را به میزان ۰/۱ رقیق می کنیم. مقدار کمی از کلنی باکتری کشت داده شده در محیط نوترینت آگار را به وسیله پپت پاستور و یا هر وسیله مناسب دیگر برداشته و روی لام قرار داده سپس یک قطره از H_2O_2 ۳٪ را روی آن چکانده، که ایجاد حباب نشان دهنده وجود آنزیم کاتالاز در باکتری است.



شکل ۳-۱. واکنش کاتالاز

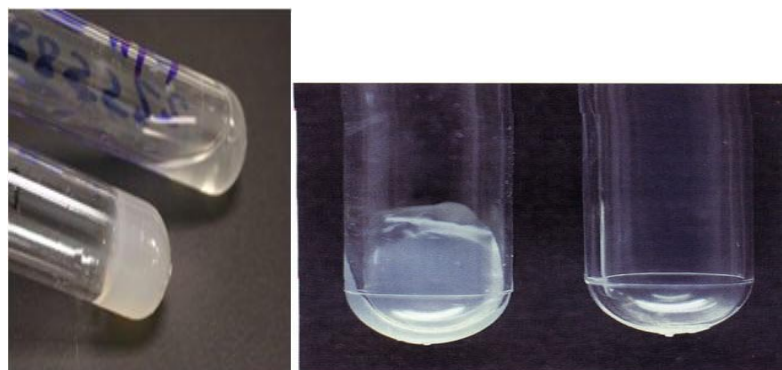
- آزمایش کوآگولاز روش لام: بر روی کلیه نمونه ها ابتدا تست کوآگولاز به روش اسلایدی انجام شد. بدین صورت که یک کلنی از باکتری را در یک قطره سرم فیزیولوژی کاملاً حل کرده سپس یک قطره پلاسمای خرگوش دارای EDTA (شرکت سیگما، آلمان) به آن اضافه کرده و با حرکت دورانی لام آن را مخلوط کرده و تشکیل لخته و مثبت شدن تست بررسی گردید.



شکل ۳-۲. کوآگولاز اسلایدی بر روی لام میکروسکوپی

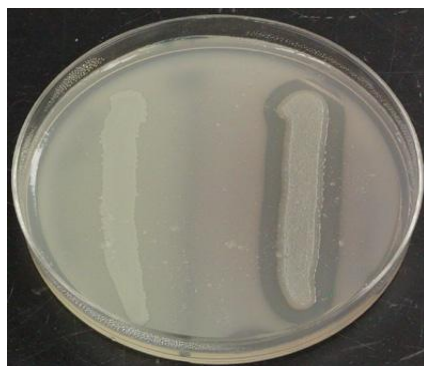
- کوآگولاز لوله ای: ایزوله هایی که در روش اسلایدی منفی شدند با روش لوله ایی نیز تست می گردند. در این روش مستقیماً یک لوپ پر از باکتری را به ۰/۵ سی سی پلاسمای رقیق شده اضافه و به مدت ۴ ساعت در $37-35^{\circ}\text{C}$ قرار می گیرد. پس از زمان انکوباسیون در صورت عدم مشاهده لخته و منفی بودن نتیجه آن، یک شبانه روز در درجه حرارت اتاق انکوبه شده. زیرا برخی سویه ها اگر به مدت طولانی در 35°C درجه

قرار گیرند آنزیم فیبرینولیزین تولید می کنند، که سبب حل شدن لخته در زمان انکوباسیون می شود و در صورت عدم وجود لخته، منفی تلقی می گردید. از سویه های کنترل مثبت و منفی جهت کنترل پلاسما استفاده می شد.



شکل ۳-۳. تست کوآگولاز لوله ای

- آزمایش DNase: کشت تلقیحی کلنی باکتری به صورت نقطه ایی در محیط DNAase آگار (QUELAB، انگلستان) انجام شد و محیط به مدت یک شبانه روز در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. پس از گذشت این دوره با مشاهده رشد باکتری، چند قطره اسیدکلریدریک یک نرمال را بر سطح محیط ریخته و بعد از چند دقیقه اگر اطراف منطقه کشت هاله شفاف مشاهده گردد، تست مثبت تلقی می گشت. در این آزمایش از کنترل مثبت و منفی استفاده شده است.



شکل ۳-۴. تست DNase

- آزمایش مانیتول سالت آگار : از محیط نوترینت آگار یک کلنی برداشته و در لوله های حاوی محیط مانیتول سالت آگار (QUELAB، انگلستان) به صورت عمقی کشت می دهیم. پس از یک شبانه روز انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد، اگر باکتری قادر می بود از قند مانیتول استفاده کند، با تولید اسید رنگ محیط از صورتی به زرد تبدیل می شود.



شکل ۳-۵. تست مانیتول سالت آگار روی پلیت

آماده سازی محیط ها، بافرها و محلول های استفاده شده:

محیط آگار خون دار :

با استفاده از محیط Blood Agar Base، طبق دستور کارخانه سازنده، پس از حل کردن پودر محیط با حجم تعیین شده آب و جوشاندن آن، محیط جهت استریل شدن، اتوکلاو شد و پس از رسیدن دمای محیط کشت به ۵۰°C، ۵٪ خون کامل انسان در مجاورت شعله به آن اضافه شد، همچنین هنگام ریختن خون ارلن های

محیط کشت به آرامی تکان داده شد تا کاملاً خون با محیط هموژن شود، سپس در پلیت های استریل توزیع گردید. برای کنترل آلودگی، پلیت ها به مدت یک شبانه روز در 37°C ، انکوبه شدند. پس از آن برای نگهداری به یخچال انتقال داده شدند. از این محیط برای ایزولاسیون اولیه باکتری ها استفاده شد.

۳-۵ ذخیره سازی سویه های به دست آمده

با استفاده از تست های فوق 230°C ایزوله /استافیلوکوکوس/اورئوس تعیین هویت شده و برای انجام آزمایشات بعدی یک لوپ پر از جدایه^{۵۲} کشت ۲۴ ساعته باکتری به ویال های حاوی محیط تریپتی کیس سوی برات (TSB) (Merck، آلمان) استریل و ۱۰ درصد گلیسرول اضافه گردید و پس از ۱۸-۲۴ ساعت گرماگذاری در 35°C به فریزر -20°C منتقل شد. از محیط TSB استریل حاوی ۲۰ درصد گلیسرول و خون جهت ذخیره باکتری در فریزر -80°C استفاده شد.

۳-۶ تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی

- دیسک دیفیوژن آگار^{۵۳}:

برای انجام تست آنتی بیوگرام ابتدا از باکتری ها غلظتی معادل ۰/۵ مک فارلند استاندارد^{۵۴} تهیه شد.

- تهیه استاندارد ۰/۵ مک فارلند :

برای تهیه ۰/۵ مک فارلند (غلظت $10^8 \times 1/5$ میلی لیتر)، ۰/۵ میلی لیتر از کلرید باریوم (BaCl_2) ۰/۰۴۸

^{۵۲} Isolate

^{۵۳} Agar Disk Diffusion

^{۵۴} McFarland standards

mol/l را به ۹۹/۵ میلی لیتر اسید سولفوریک ۰/۱۸ mol/l مخلوط شد. در ضمن استاندارد مورد نظر، در تاریکی و دمای اتاق، به مدت ۶ ماه پایداری دارد. از آن به عنوان استاندارد سوسپانسیون سلولی جهت آنتی بیوگرام استفاده شد. چگالی صحیح کدورت استاندارد با استفاده از اسپکتروفتومتر با طول موج ۶۲۵ نانومتر مشخص شد. OD^{۵۵۰} نیم مک فارلند در این طول موج معادل ۰/۱۳ - ۰/۰۸ است.

برای انجام تست دیسک دیفیوژن آگار ابتدا محیط مولر هیتون آگار^{۵۶} طبق دستور العمل CLSI تهیه شد. برای این منظور محیط در پلیت های ۱۲ سانتی متری به عمق ۴ میلیمتر پخش شده و پس از بسته شدن محیط درون پلیت ها، برای کنترل آلودگی ۲۴ ساعت در ۳۵ °C گرماگذاری شد. از کشت ۱۸-۲۴ ساعته باکتری های رشد یافته در محیط نوترینت آگار سوسپانسیونی با کدورتی معادل غلظت ۰/۵ مک فارلند تهیه شد. سپس از این سوسپانسیون با سواب استریل روی محیط مولر هیتون آگار در سه جهت مختلف تلقیح کرده و پس از چند دقیقه دیسک های آنتی بیوتیک با فاصله ۲۲ میلیمتر از یکدیگر و ۱۶ میلیمتر از جداره پلیت روی محیط قرار داده شدند. پس از آن در دمای ۳۵ °C گرماگذاری شده و سپس قطر هاله عدم رشد برای کلیه آنتی بیوتیک ها پس از ۱۶-۲۰ با خط کش قرائت شد.

از سویه استاندارد *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 و دیسک تریمتوپریم - سولفامتاکسوزول^{۵۷} جهت کنترل کیفی محیط موار هیتون آگار و از سویه استاندارد *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 جهت کنترل آزمایشات تعیین حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک ها استفاده شد.

^{۵۵} Optical Density

^{۵۶} Muller-Hinton Agar

^{۵۷} Trimethoprim/sulfamethoxazole

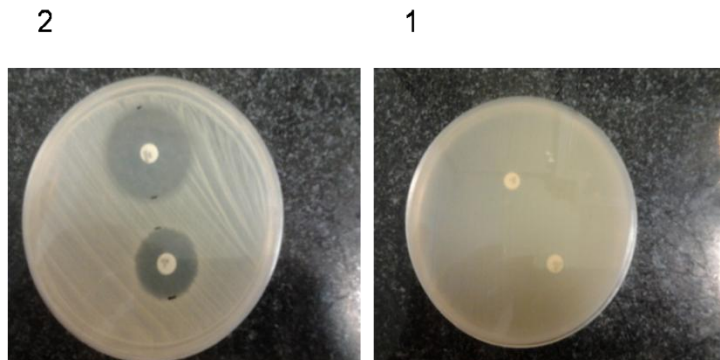
آنتی بیوتیک های مورد استفاده در این طرح بر اساس جدول زیر می باشد :

جدول ۳-۲. آنتی بیوتیک های مورد استفاده در روش دیسک دیفیوژن

Piperacillin-tazobactam	۱۱۰ (μm)
Imipenam	۱۰ (μm)
Cefuroxium	۳۰ (μm)
Levofloxacin	۵ (μm)
Moxifloxacin	۵ (μm)

۳-۷ تعیین سویه های MRSA و MSSA

براساس روش دیسک دیفیوژن، تمامی ۲۳۰ ایزوله استافیلوکوکوس/اورئوس برای تعیین MRSA. مورد آزمایش قرار گرفتند. مقاومت و حساسیت به دیسک های اگزاسیلین و سفوکسیتین در شکل ۳-۶ آورده شده است.



شکل ۳-۶. روش دیسک دیفیوژن با دیسک های اگزاسیلین و سفوکسیتین.

۱. مقاومت به اگزاسیلین، ۲. حساسیت به اگزاسیلین

۳-۸ تعیین الگوی مقاومت دارویی چندگانه تمامی ایزوله ها

تمامی ایزوله ها از جهت الگوی مقاومت دارویی چندگانه مورد ارزیابی قرار گرفتند که این الگو (MDR) به این صورت تعریف می شود که اگر ایزوله ای حداقل به یک عامل آنتی بیوتیکی در سه یا تعداد بیشتری از گروه های مختلف آنتی بیوتیکی طبقه بندی شده مقاوم باشد آن ایزوله، دارای الگوی مقاومت دارویی چندگانه می باشد (۱۲۶).

۳-۹ روش های تشخیص مولکولی

۳-۹-۱ استخراج DNA ژنومیک

مواد و وسایل مورد نیاز

۱. محیط LB

۲. ایزوپروپانول

۳. لیزواستافین

۴. پودر تریس

۵. پودر EDTA

۶. کیت استخراج

۷. سمپلر و سر سمپلر

۸. میکروتیوب ۱/۵

۹. شیکر (shaker)

۱۰. میکروسانتریفیوژ

۱۱. انکوباتور شیکردار

۱۲. انکوباتور ۳۷ درجه

۱۳. ترموبلوک یا بن ماری ۶۰ درجه

۱۴. نانودراپ

پیش از استفاده از کیت استخراج مراحل برای آماده سازی نیاز است که عبارتند از: ابتدا تمامی ایزوله ها در ۱-۵ ml محیط (Luria broth (LB به مدت یک شبانه روز در انکوباتور شیکردار تنظیم شده در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه داده شدند . سپس تمامی نمونه ها به مدت ۲۰ دقیقه در ۵۰۰۰ دور سانتریفیوژ شده و به رسوب به دست آمده ۱۸۵ میکرولیتر بافر TE (1X که ترکیبی از پودر تریس و EDTA (Merck، آلمان) است (ضمیمه ۱) و ۱۵ میکرولیتر لیزواسستافین نو ترکیب (۱۵ میلی گرم بر میلی لیتر، شرکت سیگما آلمان) اضافه شد. در ادامه به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شد. پس از آن DNA ژنومی تمامی نمونه ها با استفاده از کیت استخراج DNA genomic DNA kit

(extraction Bioneer Inc., South Korea) طبق دستور العمل آن استخراج گردید. جهت تایید

غلظت DNA استخراجی ، تمامی نمونه ها توسط سیستم نانودراپ (آمریکا) در نسبت A260 به A280

اندازه گیری شدند.



شکل ۳-۷. اندازه گیری غلظت DNA استخراجی توسط دستگاه نانو دراپ

۳-۹-۲ استخراج پلاسمید

استخراج پلاسمید نیز طبق دستورالعمل کیت Nano-Plasmid Mini Extraction Kit (Bioneer, South Korea)

انجام شد. البته قابل توجه است که استخراج پلاسمید تنها برای نمونه هایی که از لحاظ حضور کلاس های

اینتگرانی مثبت بودند انجام گرفت. آماده سازی نمونه ها برای استخراج پلاسمید همانند استخراج DNA

ژنومیکی بود که قبلاً بیان شده است.

۳-۹-۳ انجام PCR

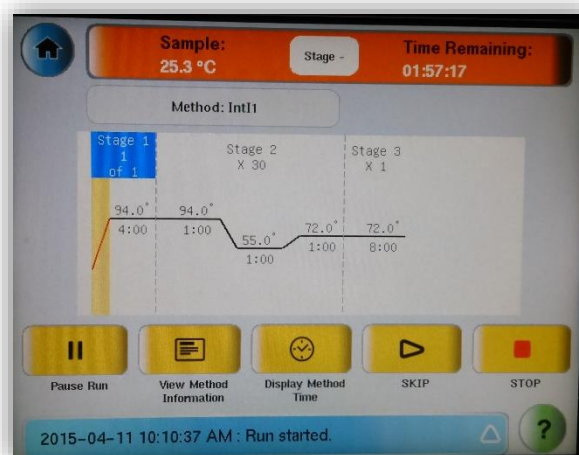
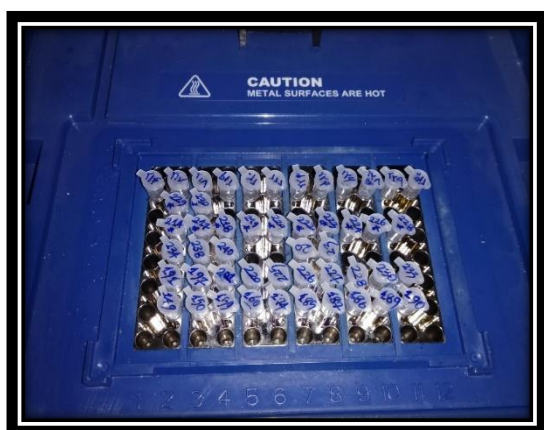
مواد و وسایل مورد نیاز PCR

۱. ترموسایکلر
۲. میکروسانتریفیوژ
۳. میکروتیوب ۱/۵، ۰/۵ و ۰/۲ میکرولیتر
۴. سمپلر و سر سمپلر های مختلف
۵. شیکر
۶. پرایمر
۷. آب دیونیزه استریل
۸. $MgCl_2$
۹. PCR buffer
۱۰. dNTPs
۱۱. Taq polymerase
۱۲. DNA template

۳-۹-۴ PCR ژن های مورد مطالعه:

برای تعیین هویت مولکولی ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* از ژن *femA* که در تمامی ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* حضور دارد، استفاده شد. بنابراین تمامی ایزوله ها از نظر حضور ژن *femA* با استفاده از آزمون PCR بررسی شدند. سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت.

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. هر واکنش PCR شامل ۲۰۰ میکرومول dNTP (ژن فن آوران)، ۱۰ پیکومول از هر پرایمر (شرکت ژن فن آوران، ایران)، ۱/۵ میلی مول در لیتر $MgCl_2$ (ژن فن آوران)، ۰/۵ واحد آنزیم Taq (ژن فن آوران) و ۵۰ نانوگرم DNA الگو می باشد. تکثیر ژن مذکور تحت شرایط جدول ۳-۳ با استفاده از دستگاه ترمال سیکلر (Applied biosystem, USA) انجام شد. تمامی واکنش ها در ۳۵ سیکل انجام گردید. پرایمرهای ژن *fema* در جدول ۳-۴ آورده شده است.



شکل ۳-۸. دستگاه ترموسایکلر و چیدمان نمونه ها در داخل آن

PCR ژن های کلاس های اینتگرونی:

واکنش زنجیره ایی پلیمراز بر روی تمامی ۲۳۰ ایزوله /استافیلوکوکوس اورئوس برای ژن های *IntI 3, IntI 2, IntI 1* که به ترتیب کد کننده پروتئین های ایتگراز ژن های کلاس های اینتگرونی ۱، ۲ و ۳ می باشند، انجام گرفت. پرایمرهای ژن های *IntI 3, IntI 2, IntI 1* در جدول ۳-۴ آورده شده است.

واکنش PCR برای این ژن ها طبق غلظت مواد مورد نیاز برای ژن femA و در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت.

۳-۱۰ الکتروفورز محصول های PCR

مواد و وسایل مورد نیاز

۱۳. پودر آگارز (Agarose)

۱۴. بافر TBE 1X (Tris-HCl Boric Acid EDTA)

۱۵. (Fermentase) Loading Buffer

۱۶. (Fermentase) (Ladder) Marker

۱۷. سینی ژل (Gel Tray)

۱۸. شانه ژل (Gel Comb)

۱۹. تانک الکتروفورز (Electrophoresis Tank)

۲۰. منبع تغذیه الکتریکی (Power supply)

۲۱. سمپلر و سرسمپلر (Tip)

❖ تهیه بافر 1x TBE:

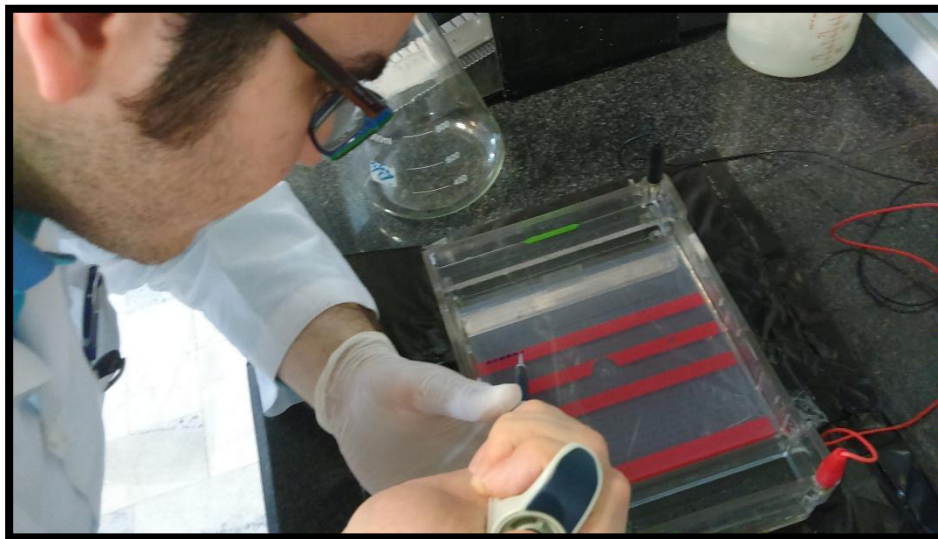
برای تهیه بافر TBE 10X ۱۰۸ گرم از Tris و ۵۵ گرم از بوریک اسید در ۹۰۰ میلی لیتر آب حل کرده و سپس 40ml EDTA (0.5mM , pH=8) به آن اضافه شد و بعد حجم به یک لیتر رسانده شد. سپس بافر 1X TBE از بافر 10X تهیه و از آن در تانک الکتروفورز و تهیه ژل استفاده گردید.

❖ تهیه ژل الکتروفورز:

برای الکتروفورز محصولات PCR از ژل ۱ درصد آگارز استفاده شد. بدین صورت که مقدار مورد نیاز از پودر آگارز (۱۳۰ میلی گرم) در مقدار مورد نیاز از بافر 1x TBE حل و بمدت ۲ دقیقه توسط مایکروو حرارت داده شد تا محلول کاملاً شفاف به دست آمد. به ژل ذوب شده به میزان ۷ لاندا (۰/۰۰۷ میلی لیتر) اتیدیوم برومید اضافه گردید و سپس داخل سینی الکتروفورز که داخل آن شانه تنظیم گردیده ، ریخته شد تا ژل به صورت جامد درآمد. بعد از گذشت ۳۰ دقیقه با احتیاط شانه از ژل خارج گردید و ژل برای الکتروفورز داخل تانک الکتروفورز قرار داده شد. نکته حایز اهمیت این است که هنگام اضافه کردن اتیدیوم برومید به ژل ذوب شده باید دقت شود هنگامی که مادامی که ژل ذوب شده دارای بخار حاصل از گرما زیاد می باشد این عمل انجام نگیرد زیرا موجب آزاد شدن بخارات سمی خطرناک می شود.

❖ روش انجام الکتروفورز:

بافر 1X TBE را به مقدار مورد نیاز در داخل تانک الکتروفورز ریخته و سینی حاوی ژل ۱ درصد را در درون تانک قرار داده شد. به کمک سمپلر مقدار ۶-۷ میکرولیتر از مارکر با احتیاط و به آرامی در داخل یکی از چاهک های ژل (معمولا در اولین چاهک از سمت شروع) ریخته شد. سپس مقداری (۷ لاند) از محلول Loading Buffer (6X) را نسبت به اندازه چاهک بوسیله سمپلر با نسبت ۱ به ۶ با محصول PCR مخلوط کرده و به آرامی و با احتیاط در داخل چاهک ژل ریخته شد (شکل ۳-۹ الف). درب تانک بسته و به منبع تغذیه الکتریکی وصل گردید. منبع تغذیه الکتریکی روی ولتاژ مناسب تنظیم شد. میزان ولتاژ نسبت به اندازه باند تنظیم شد. پس از پایان زمان الکتروفورز (بسته به ولتاژ و اندازه ژل ۴۰ دقیقه تا ۱ ساعت)، منبع تغذیه الکتریکی خاموش شد و با رعایت ایمنی ژل را از تانک خارج گردید و در دستگاه Gel-Documentation (شکل ۳-۹ ب) قرار داده و تحت نور UV عکس گرفته شد.



شکل الف



شکل ب

شکل ۳-۹. الف) دستگاه الکتروفورز (هنگام بارگزاری محصولات PCR درون چاهک های ژل)، ب) دستگاه Gel Doc

جدول ۳-۳ شرایط دمایی و زمانی سیکل های PCR ژن های *FemA*, *IntI 1*, *IntI 2*, *IntI 3*

Genes	Initial Denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Final Extension
<i>femA</i>	94°C for 5 min	94°C for 1 min	58°C for 1 min	72°C for 1 min	72°C for 7 min
<i>IntI 1</i>	94°C for 5 min	94°C for 1 min	60°C for 1 min	72°C for 1 min	72°C for 8 min
<i>IntI 2</i>	94°C for 5 min	94°C for 1 min	59°C for 1 min	72°C for 1 min	72°C for 8 min
<i>IntI 3</i>	94°C for 5 min	94°C for 1 min	57°C for 1 min	72°C for 1 min	72°C for 8 min

جدول ۳-۴ توالی پرایمرها و سایز باندهای محصولات PCR ژن های *FemA*, *IntI 1*, *IntI 2*, *IntI 3*

Genes	Primers (5'-3')	Size of amplified product (bp)	References
<i>femA</i>	F-AAAAAAGCACATAACAAGCG R-GATAAAGAAGAAACCAGCAG	132	(۱۲۷)
<i>IntI 1</i>	F-CCTCCCGCACGATGATC R-TCCACGCATCGTCAGGC'	280	(۱۲۳)
<i>IntI 2</i>	F-GTA GCA AAC GAG TGA CGA AAT G R-CAC GGA TAT GCG ACA AAA AGG T	788	(۱۲۳)
<i>IntI 3</i>	F- GCCTCCGGCAGCGACTTTTCAG R- GATGCTGCCCAGGGCGCTCG	433	(۱۲۸)

۱۱-۳ تعیین توالی (sequencing)

محصول PCR هر یک از ژن ها در صورت بارز شدن باند های اختصاصی آنها بر روی ژل جهت تایید حضور ژن مورد نظر به صورت اتفاقی انتخاب و چند نمونه از آنها به شرکت ژن فناوران ارسال شد. و این شرکت نمونه ها را برای تولی یابی به Macrogene (کره جنوبی) ارسال گردید. پس از دریافت نتایج توالی ها با نرم افزار Chromas بررسی و سپس جهت آنالیز ابتدا در NCBI بلاست (Blast)^{۵۸} شده و با ژن های سویه های که توالی آنها ثبت شده و بیشترین مراجعه را داشته ردیف سازی^{۵۹} انجام شد.

۱۲-۳ روش جمع آوری و تجزیه و تحلیل داده ها

پس از جمع آوری داده ها یافته ها در قالب جداول فراوانی نمودار و شاخص های عددی ارائه گردید. برای تحلیل داده ها از آزمون مجذور کای و تست دقیق فیشر استفاده شد. داده ها به وسیله ی نرم افزار SPSS ویرایش ۱۶ تجزیه و تحلیل شد.

^{۵۸} Basic Local Alignment Search Tool

^{۵۹} Alignment



بخش چهارم

یافته ها

۴-۱ فراوانی ایزوله های بدست آمده از بیمارستان های مختلف

در مجموع ۲۳۰ ایزوله از بیمارستان های آموزشی قزوین (بوعلی، شهید رجایی، قدس و کوثر) و امام حسین (ع) تهران در مدت ۱۱ ماه جمع آوری گردید. ایزوله ها به ترتیب بیشتر از بیمارستان امام حسین (ع) (داخلی ۶۰۰ تخت خوابی) ۱۳۵ ایزوله (۶۷/۵٪)، قدس (کودکان) ۲۲ ایزوله (۱۱٪)، شهید رجایی (جراحی و سوانح) ۲۱ ایزوله (۱۰/۵٪)، بوعلی (داخلی) ۱۵ ایزوله (۷/۵٪) و کوثر (زنان) ۷ ایزوله (۳/۵٪) جمع آوری شدند.

۴-۲ فراوانی ایزوله ها از نظر جنسیت

از ۲۳۰ بیمار بستری در بیمارستان های مذکور، به ترتیب از جنس مرد، ۱۴۱ مورد (۶۱/۳٪) ایزوله، و از جنس زن ۸۹ مورد (۳۸/۷٪) ایزوله /استافیلوکوکوس اورئوس جدا شد. میانگین سنی بیماران بستری مورد مطالعه ۴۴/۸ سال محاسبه گردید.

۴-۳ فراوانی ایزوله ها از نظر نمونه های مورد آزمایش

ایزوله های /استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه های مختلف جمع آوری شدند که از آن میان بیشترین درصد را نمونه های خون (۲۳/۹ درصد) و خلط (۲۳/۵ درصد) و کمترین درصد را نمونه های بافت (۱ درصد) و چشم (۰/۵ درصد) به خود اختصاص دادند. توزیع ایزوله های جمع آوری شده از نمونه های مختلف به شرح جدول ۴-۱ بودند.

جدول ۴-۱. توزیع فراوانی ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس بر حسب نوع نمونه

نوع نمونه	تعداد	درصد (%)
خون	۵۵	۲۳/۹
خلط و ترشحات تنفسی	۵۴	۲۳/۵
آبسه و زخم های پوستی	۵۳	۲۳
کاتتر	۲۲	۹/۶
ادرار	۲۰	۸/۷
مایعات استریل بدن	۱۹	۸/۲
سایر	۷	۳
جمع کل	۲۳۰	۱۰۰

۴-۴ فراوانی ایزوله های به دست آمده از بخش های مختلف بیمارستانی

ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس از بخش های مختلف بیمارستانی جمع آوری شدند. توزیع ایزوله های جمع آوری شده از بخش های مختلف بیمارستانی به شرح جدول ۴-۲ بودند. همانطور که مشخص است ایزوله ها بیشتر از بخش های داخلی (۴۸ درصد) و مراقبت های ویژه (۳۰/۵ درصد) جداسازی شدند.

جدول ۴-۲. توزیع فراوانی ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس بر حسب بخش بیمارستانی

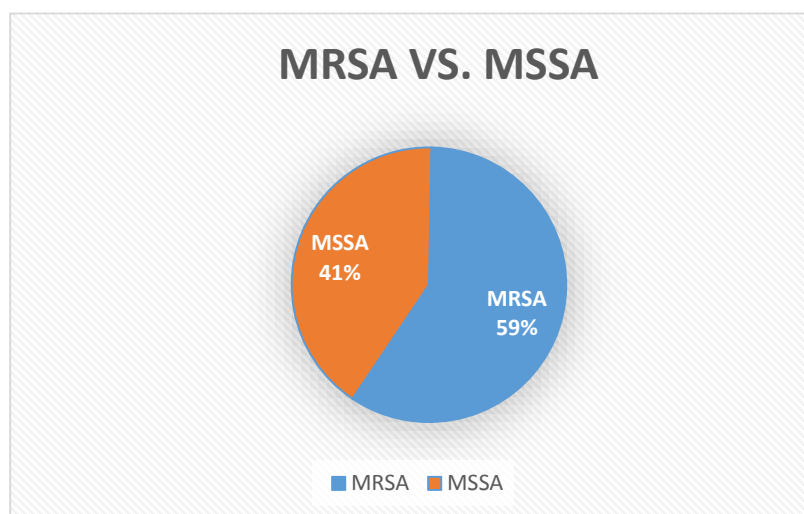
بخش	تعداد	درصد (%)
داخلی	۱۱۰	۴۷/۶
مراقبت های ویژه	۷۱	۳۰/۶
نوزادان	۱۹	۷
جراحی	۱۰	۴/۳
نورولوژی	۴	۱/۷
ارتوپدی	۴	۱/۷
CCU	۳	۱/۵
گوارش	۲	۱/۳
سوختگی	۲	۱/۳
عفونی	۲	۱/۳
چشم	۲	۱/۳
رادیوتراپی	۱	۰/۴
جمع کل	۲۳۰	۱۰۰

۴-۵ فراوانی ایزوله های MRSA و MSSA

براساس روش دیسک دیفیوژن با استفاده از دیسک سفوکسیتین برای تمامی ۲۳۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس

انجام پذیرفت، مشخص شد که ۱۳۶ ایزوله (۱/۵۹٪) به متی سیلین مقاوم و ۹۴ ایزوله (۹/۴۰٪) حساس به متی سیلین بودند.

نمودار ۴-۱ فراوانی ایزوله های MRSA و MSSA



۴-۶ تعیین الگوی مقاومت دارویی چندگانه تمامی ایزوله ها.

تمامی ایزوله ها از جهت بررسی الگوی مقاومت دارویی چندگانه مورد ارزیابی قرار گرفتند که نتایج آن در جدول زیر مشخص شده است

جدول ۴-۳. تعداد ایزوله های دارا و فاقد الگوی مقاومت چندگانه

مجموع	ایزوله های Non-MDR	ایزوله های MDR
۲۳۰	۸۹	۱۴۱
(۱۰۰٪)	(۷/۳۸٪)	(۳/۶۱٪)

۴-۶-۱ ارزیابی الگوهای حساسیت آنتی بیوتیکی

تمامی ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* که دارا و فاقد الگوی مقاومت چندگانه بودند طبق جدول زیر بررسی شد و نتایج مقایسه ای آنها به صورت مجزا آورده شده است.

جدول ۴-۴. بررسی الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* دارا و فاقد الگوی مقاومت دارویی چندگانه

آنتی بیوتیک			دارای الگوی مقاومت دارویی چندگانه (N= ۱۴۱)			فاقد الگوی مقاومت دارویی چندگانه (N= ۸۹)			مجموع (N= ۲۳۰)		
حساس	حد واسط	مقاوم	حساس	حد واسط	مقاوم	حساس	حد واسط	مقاوم	حساس	حد واسط	مقاوم
جنتامایسین	۳۷ (٪۱۶/۱)	۲ (٪۰/۹)	۱۰۲ (٪۴۴/۳)	۱ (٪۰/۴)	۸۲ (٪۳۵/۷)	۶ (٪۲/۶)	۱ (٪۰/۴)	۳ (٪۱/۳)	۱۱۹ (٪۵۱/۷)	۳ (٪۱/۳)	۱۰۸ (٪۴۷)
آمیکاسین	۳۸ (٪۱۶/۵)	۲ (٪۰/۹)	۱۰۱ (٪۴۳/۹)	۱۳ (٪۵/۷)	۷۱ (٪۳۰/۹)	۵ (٪۲/۲)	۱۳ (٪۵/۷)	۱۵ (٪۶/۵)	۱۰۹ (٪۴۷/۴)	۱۵ (٪۶/۵)	۱۰۶ (٪۴۶/۱)
توبرامایسین	۳۵ (٪۱۵/۲)	۴ (٪۱/۷)	۱۰۲ (٪۴۴/۳)	۵ (٪۲/۲)	۷۸ (٪۳۳/۹)	۶ (٪۲/۶)	۵ (٪۲/۲)	۹ (٪۳/۹)	۱۱۳ (٪۴۹/۱)	۹ (٪۳/۹)	۱۰۸ (٪۴۷)
ریفامپسین	۶۴ (٪۲۷/۸)	۱ (٪۰/۴)	۷۶ (٪۳۳/۰)	۲ (٪۰/۹)	۷۹ (٪۳۴/۳)	۸ (٪۳/۵)	۲ (٪۰/۹)	۳ (٪۱/۳)	۱۴۳ (٪۶۲/۲)	۳ (٪۱/۳)	۸۴ (٪۳۶/۵)
پنی سیلین	۳ (٪۱/۳)	۰	۱۳۸ (٪۶۰/۰)	۰	۲ (٪۰/۹)	۸۷ (٪۳۷/۸)	۰	۰	۵ (٪۲/۲)	۰	۲۲۵ (٪۹۷/۸)
اگزاسیلین	۴۹ (٪۲۱/۳)	۳ (٪۱/۳)	۸۹ (٪۳۸/۷)	۴ (٪۱/۷)	۸۳ (٪۳۶/۱)	۲ (٪۰/۹)	۴ (٪۱/۷)	۷ (٪۳)	۱۳۲ (٪۵۷/۴)	۷ (٪۳)	۹۱ (٪۳۹/۶)
سیپروفلوکساسین	۳۱ (٪۲۲)	۵ (٪۳/۵)	۱۰۵ (٪۷۴/۵)	۱۰ (٪۱۱/۲)	۶۹ (٪۷۷/۵)	۱۰ (٪۱۱/۲)	۱۰ (٪۱۱/۲)	۱۵ (٪۶/۵)	۱۰۰ (٪۴۳/۵)	۱۵ (٪۶/۵)	۱۱۵ (٪۵۰)
لووفلوکساسین	۴۳	۶	۹۲	۲	۷۹	۸	۲	۸	۱۲۲	۸	۱۰۰

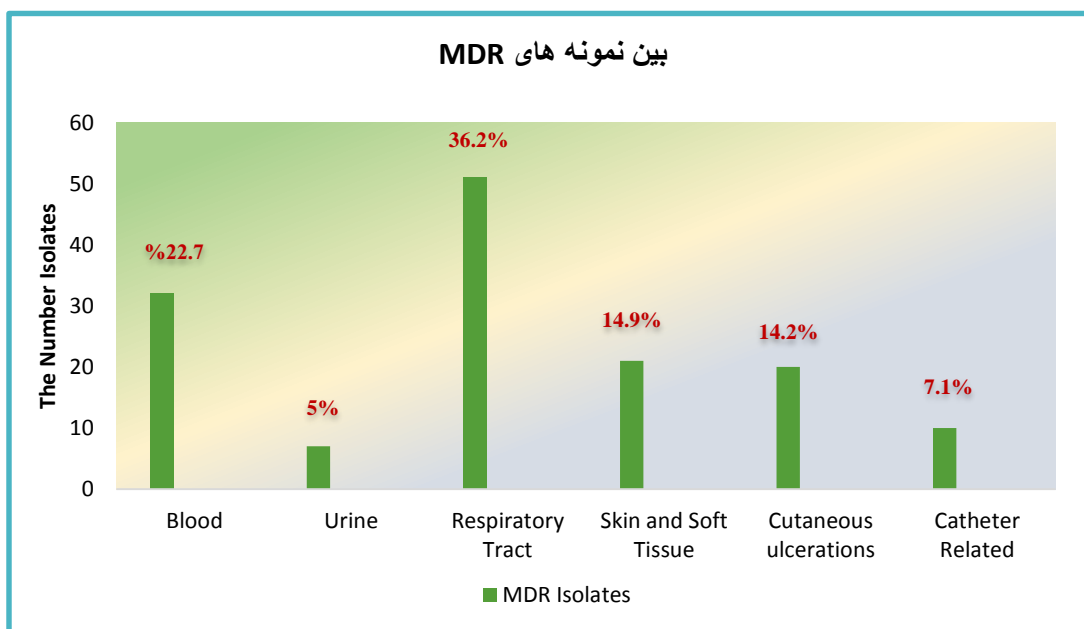
(/٤٣/٥)	(/٣/٥)	(/٥٣)	(/٩)	(/٢/٢)	(/٨٨/٨)	(/٦٥/٢)	(/٤/٣)	(/٣٠/٥)	
٩٧	١٠	١٢٣	٨	٤	٧٧	٨٩	٦	٤٦	موکسی فلوکساین
(/٤٢/٢)	(/٤/٣)	(/٥٣/٥)	(/٣/٥)	(/١/٧)	(/٣٣/٥)	(/٣٨/٧)	(/٢/٦)	(/٢٠/٠)	
٣٩	١	١٩٠	١	١	٨٧	٣٨	.	١٠٣	کوتری موکسازول
(/١٧)	(/٠/٤)	(/٨٢/٦)	(/٠/٤)	(/٠/٤)	(/٣٧/٨)	(/١٦/٥)		(/٤٤/٨)	
١٠	٣٩	١٨١	٣	١٨	٦٨	٧	٢١	١١٣	تیکوپلانیل
(/٤/٣)	(/١٧)	(/٧٨/٧)	(/١/٣)	(/٧/٨)	(/٢٩/٦)	(/٣/٠)	(/٩/١)	(/٤٩/١)	
٨٦	٩	١٣٥	٤	١	٨٤	٨٢	٨	٥١	کلیندامایسین
(/٣٧/٤)	(/٣/٩)	(/٥٨/٧)	(/١/٧)	(/٠/٤)	(/٣٦/٥)	(/٣٥/٧)	(/٣/٥)	(/٢٢/٢)	
١٠٤	٢٥	١٠١	١٠	١٠	٦٩	٩٤	١٥	٣٢	اریترومایسین
(/٤٥/٢)	(/١٠/٩)	(/٤٣/٩)	(/٤/٣)	(/٤/٣)	(/٣٠/٠)	(/٤٠/٩)	(/٦/٥)	(/١٣/٩)	
٦	.	٢٢٤	٣	.	٨٦	٣	.	١٣٨	لینوزولونید
(/٢/٦)		(/٩٧/٤)	(/١/٣)		(/٣٧/٤)	(/١/٣)		(/٦٠/٠)	
٨	٢٢	٢٠٠	.	٩	٨٠	٨	١٣	١٢٠	کلرامفنیکل
(/٣/٥)	(/٩/٦)	(/٨٧)		(/٣/٩)	(/٣٤/٨)	(/٣/٥)	(/٥/٧)	(/٥٢/٢)	
١٣٤	٧	٨٩	٢٢	٥	٦٢	١١٢	٢	٢٧	تتراسایکلین
(/٥٨/٣)	(/٣)	(/٣٨/٧)	(/٩/٦)	(/٢/٢)	(/٢٧/٠)	(/٤٨/٧)	(/٠/٩)	(/١١/٧)	

٤-٦-٢ تعیین الگوی MDR بر حسب نوع نمونه های گرفته شده از بیمارستان ها

جهت سهولت بررسی و رسم نمودار نوع نمونه های گرفته شده در ٥ گروه اصلی مختلف طبقه بندی شده اند که

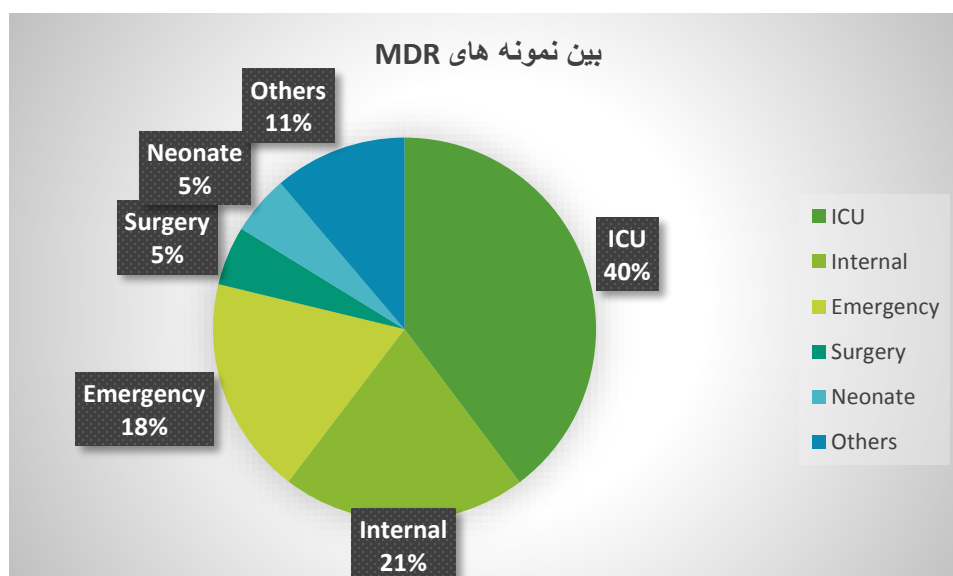
در نمودار زیر مشخص شده است.

نمودار ۴-۲ فراوانی نوع نمونه های گرفته شده در بین ایزوله های MDR



۴-۶-۳ تعیین الگوی MDR بر حسب بخش های جدا شده از بیمارستان ها

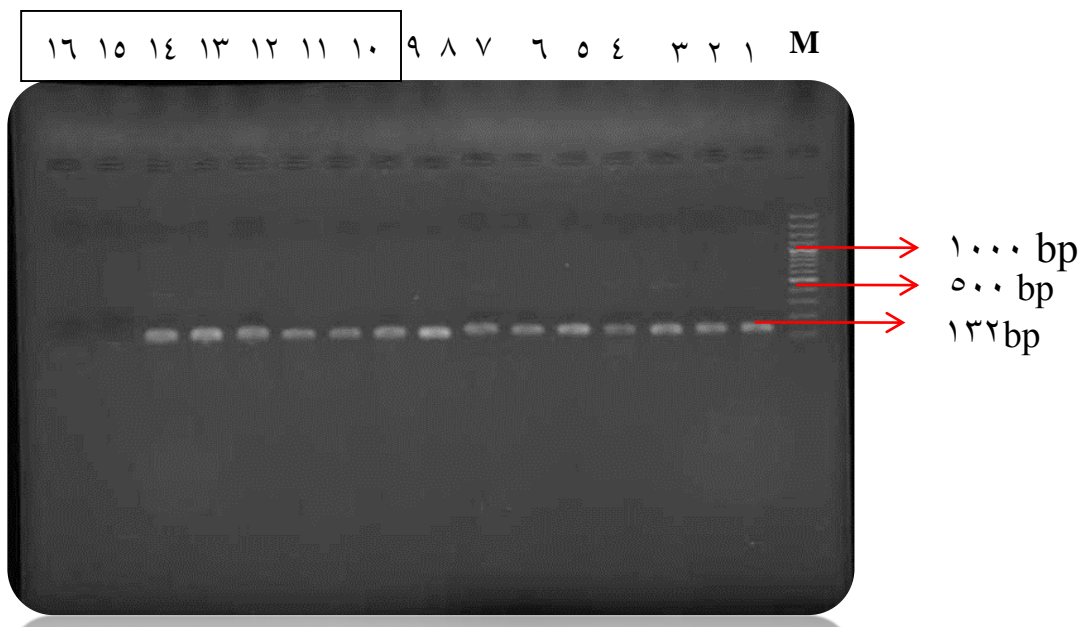
نمودار ۴-۳ نمونه های گرفته شده بر حسب بخش های مختلف در بین ایزوله های MDR



۷-۴ نتایج روش PCR

۱-۷-۴ femA ژن

برای تمامی ایزوله ای که در روش های فنوتیپی به عنوان /استافیلوکوکوس/ اورئوس تعیین هویت شدند، PCR ژن femA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی صورت گرفت. تنها ۲ ایزوله از نظر ژن femA منفی شدند که از مطالعه خارج شدند. ۲۳۰ ایزوله /استافیلوکوکوس/ اورئوس در این روش مثبت گردیده و با این روش مولکولی مورد تایید قرار گرفتند (شکل ۱-۴).

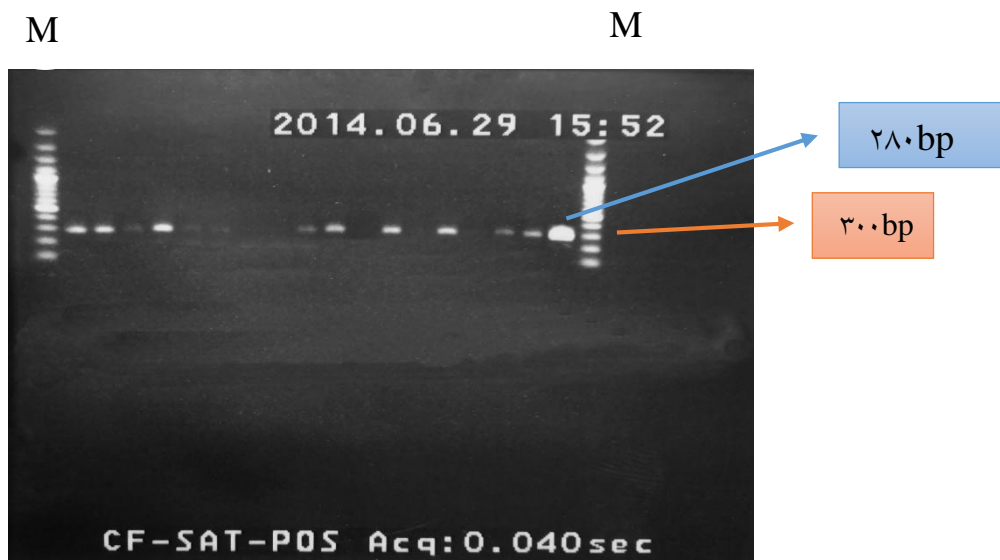


شکل ۱-۴ ژل الکتروفورز ژن femA. ردیف M مارکر ۱۰۰ bp. ردیف ۱ کنترل مثبت (ATCC 25923) ، ردیف ۲ تا ۱۴ ایزوله های بالینی مثبت ، ردیف ۱۵ ایزوله بالینی منفی و ردیف ۱۶ کنترل منفی آزمون PCR (No DNA)

۲-۷-۴ IntII ژن

با استفاده از پرایمرهای معرفی شده طبق جدول ۴-۴، PCR بر روی تمامی ۲۳۰ ایزوله /استافیلوکوکوس/

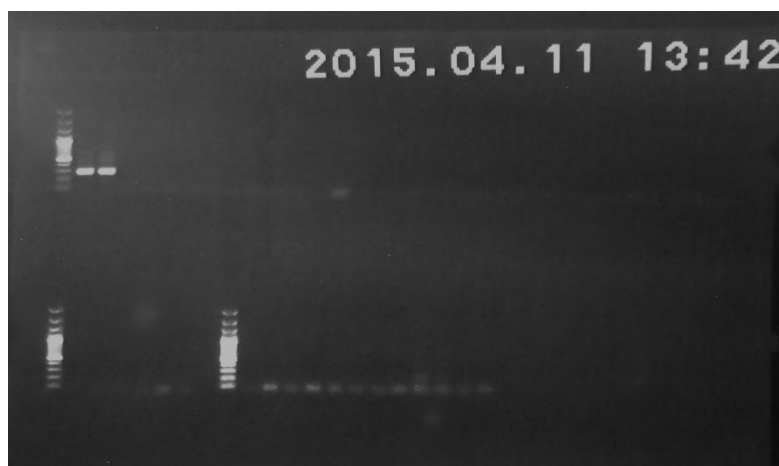
اورئوس انجام شده و ۵۷ ایزوله (۸/۲۴٪) از نظر حضور این ژن مثبت شدند (شکل ۴-۲).



شکل ۴-۲. ژل الکتروفورز ژن *IntI1*. ردیف M مارکر ۱۰۰bp. ردیف ۱ تا ۶ ایزوله های بالینی مثبت، ردیف های ۷ و ۸ ایزوله های بالینی منفی و ردیف آخر کنترل مثبت (*E. cloacae*) و ردیف ۱۵ کنترل منفی

۴-۷-۳ ژن های *IntI2*, *IntI3*

در مطالعه ی حاضر از میان ۲۳۰ ایزوله /استافیلوکوکوس/ اورئوس هیچ ایزوله ی مثبتی از لحاظ حضور این دو ژن یافت نشد (شکل ۴-۳).



شکل ۴-۳ ژل الکتروفورز *IntI2* و *IntI3*. لاین افقی اول : دو نمونه اول ژن *IntI1* مثبت هستند که صرفاً به منظور بررسی صحت انجام درست سیکل PCR قرار داده شده اند و بقیه نمونه ها (از ردیف سوم به بعد) از لحاظ حضور ژن *IntI2* و *IntI3* بررسی شدند. که همگی منفی می باشند (فاقد کنترل مثبت برای دو ژن)

۸-۴ تعیین پروفایل مقاومت آنتی بیوتیکی در ۵۷ ایزوله دارای ایتگرون کلاس ۱

از مجموع ۵۷ ایزوله دارای ژن *IntI1* تعداد ۳۸ پروفایل مقاومت آنتی بیوتیکی مختلف پیدا شد. که در بین آنها بیشترین تنوع پروفایل آنتی بیوتیکی متعلق به گروه پروفایلی PA 14 است که با تکرارپذیری ۹ بار همراه می باشد تمامی پروفایل ها در جدول زیر مشخص شده است.

جدول ۴-۵. تعیین مشخصات ایزوله های دارای ایتگرون کلاس ۱ بر حسب: نوع، بخش نمونه، بیمارستان، پروفایل مقاومت آنتی بیوتیکی و

منع فرارگیری ژن *IntI1*

Isolates	Source	Ward	Hospital	Province	Antibiotic susceptibility profile	DNA Resources	Profile Group
S.A- 8	B	Internal	Ghods	Qazvin	PEN, TET.	P	PA1
S.A-17	S	Internal	Ghods	Qazvin	PEN.	C	PA2
S.A-23	S	Neonate	Ghods	Qazvin	PEN.	P	PA2
S.A-36	R	Internal	SH. R	Qazvin	GEN, AMK, TOB, RIF, PEN, OXA, CIP, LEV, SXT, CLI, ERY, TET.	P	PA3
S.A-46	R	ICU	Kousar	Qazvin	GEN, AMK, TOB, PEN, OXA, CIP, MXF, SXT, ERY, TET.	C	PA4
S.A-47	R	Internal	SH.R	Qazvin	PEN, TEL.	P	PA5
S.A-55	U	Emergcy	I.H	Tehran	PEN, CIP, LEV, MXF, TEL.	C	PA6
S.A-56	B	Internal	I.H	Tehran	RIF, PEN, TEL.	P	PA7
S.A-61	R	ICU	I.H	Tehran	RIF, PEN, OXA, CIP, LEV, MXF, CLI, ERY, TET.	P	PA8
S.A-63	C	Emergency	I.H	Tehran	GEN, AMK, TOB, RIF, PEN, CIP, LEV, MXF, CLI, ERY, TET.	C	PA9
S.A-64	B	Emergency	I.H	Tehran	PEN.	P	PA2
S.A-75	R	ICU	I.H	Tehran	TOB, PEN, CIP, LEV, MXF, CLI.	P	PA10
S.A-102	U	Emergency	I.H	Tehran	RIF, PEN, OXA, CIP, LEV, MXF, TEL, TET.	P	PA11
S.A-112	U	Emergency	I.H	Tehran	PEN, CIP, MXF, CLI, ERY, CHL.	P	PA12
S.A-120	R	ICU	I.H	Tehran	PEN, CLI, ERY, LNZ.	C	PA13
S.A-121	S	ICU	I.H	Tehran	GEN, AMK, TOB, RIF, PEN, OXA, CIP, LEV, MXF, CLI, ERY, TET.	C	PA14
S.A-122	S	Internal	I.H	Tehran	GEN, AMK, TOB, RIF, PEN, OXA, CIP, LEV, MXF, CLI, ERY, TET.	C	PA14
S.A-127	S	ICU	I.H	Tehran	GEN, AMK, TOB, RIF, PEN, OXA, CIP, LEV, MXF, CLI, ERY, TET.	C	PA14
S.A-128	B	Radiotherapy	I.H	Tehran	PEN, CLI, ERY.	C	PA15
S.A-129	R	ICU	I.H	Tehran	GEN, AMK, TOB, RIF, PEN, OXA, CIP, LEV, MXF, SXT, CLI, ERY, CHL, TET.	C	PA16
S.A-131	S	Surgery	I.H	Tehran	RIF, PEN, CIP, TET.	C	PA17
S.A-139	S	Emergency	I.H	Tehran	PEN, SXT, TET.	C	PA18
S.A-147	S	ICU	I.H	Tehran	GEN, AMK, TOB, RIF, PEN, CIP, LEV, MXF, TET.	C	PA19

S.A-150	R	ICU	I.H	Tehran	GEN, AMK, TOB, RIF, PEN, OXA, CIP, LEV, MXF, CLI, ERY, CHL, TET.	C	PA20
S.A-151	R	ICU	I.H	Tehran	GEN, AMK, TOB, RIF, PEN, OXA, CIP, LEV, MXF, CLI, ERY, TET.	C	PA14
S.A-152	R	ICU	I.H	Tehran	GEN, AMK, TOB, RIF, PEN, OXA, CIP, LEV, MXF, CLI, ERY, TET.	C	PA14
S.A-153	R	ICU	I.H	Tehran	AMK, TOB, PEN, SXT.	C	PA21
S.A-154	R	ICU	I.H	Tehran	GEN, AMK, TOB, RIF, PEN, OXA, CIP, LEV, MXF, SXT, TEI, CLI, ERY, LNZ, TET.	C	PA22
S.A-155	S	Internal	I.H	Tehran	GEN, AMK, TOB, RIF, PEN, OXA, CIP, LEV, MXF, SXT, CLI, ERY, CHL, TET.	C	PA16
S.A-156	B	ICU	I.H	Tehran	GEN, AMK, TOB, RIF, PEN, OXA, CIP, LEV, MXF, SXT, CLI, ERY, CHL, TET.	C	PA16
S.A-161	R	ICU	I.H	Tehran	GEN, AMK, TOB, PEN, CIP, LEV, MXF, SXT, CLI, ERY, CHL, TET.	C	PA23
S.A-165	C	ICU	I.H	Tehran	GEN, AMK, TOB, PEN, SXT.	C	PA24
S.A-167	C	ICU	I.H	Tehran	GEN, AMK, TOB, RIF, PEN, OXA, CIP, LEV, MXF, CLI, ERY, TET.	C	PA14
S.A-179	R	ICU	I.H	Tehran	GEN, AMK, TOB, RIF, PEN, OXA, CIP, LEV, MXF, CLI, ERY, TET.	C	PA14
S.A-184	B	ICU	Bouali	Qazvin	PEN, SXT, CHL, TET.	C	PA25
S.A-185	B	Emergency	Bouali	Qazvin	PEN, SXT, TEI, TET.	C	PA26
S.A-186	B	Internal	Bouali	Qazvin	PEN, SXT, TEI, TET.	C	PA26
S.A-187	B	Internal	Bouali	Qazvin	PEN, CIP, SXT, TEI, TET.	C	PA27
S.A-188	B	Emergency	Bouali	Qazvin	GEN, AMK, TOB, RIF, PEN, OXA, CIP, LEV, MXF, SXT, CLI, ERY, TET.	C	PA28
S.A-189	B	Emergency	Bouali	Qazvin	PEN, TET.	C	PA1
S.A-192	S	Neonate	Ghods	Qazvin	PEN, TET.	C	PA1
S.A-193	B	Internal	Ghods	Qazvin	AMK, PEN, TET.	C	PA29
S.A-195	S	Surgery	Ghods	Qazvin	PEN, ERY.	C	PA30
S.A-197	S	Internal	I.H	Tehran	GEN, AMK, TOB, RIF, PEN, OXA, CIP, LEV, MXF, CLI, ERY, TET.	C	PA14
S.A-199	S	Emergency	I.H	Tehran	PEN, ERY.	C	PA30
S.A-200	R	Emergency	I.H	Tehran	GEN, AMK, TOB, RIF, PEN, OXA, CIP, LEV, MXF, CLI, ERY, TET.	C	PA14
S.A-214	B	Emergency	I.H	Tehran	PEN, LEV, MXF, TEI.	C	PA30
S.A-217	B	Gastro	I.H	Tehran	PEN, OXA, CIP, TEI, ERY.	C	PA31
S.A-218	S	Infective	I.H	Tehran	PEN, LEV, MXF, TET.	C	PA32
S.A-219	S	Infective	I.H	Tehran	RIF, PEN, CIP, TEI.	C	PA33
S.A-220	R	Internal	I.H	Tehran	PEN, CLI, TET.	C	PA34
S.A-222	S	Infective	I.H	Tehran	PEN, SXT, TET.	C	PA18
S.A-223	S	Emergency	I.H	Tehran	GEN, AMK, TOB, PEN, OXA, CIP, SXT, ERY, TET.	C	PA35
S.A-224	S	Surgery	I.H	Tehran	AMK, PEN, TET.	C	PA29
S.A-228	S	Infective	I.H	Tehran	GEN, AMK, TOB, PEN, OXA, CIP, LEV, MXF, SXT, ERY, TET.	C	PA36
S.A-229	S	ICU	I.H	Tehran	GEN, AMK, TOB, RIF, PEN, OXA, CIP, LEV, MXF, CLI, ERY, LNZ, TET.	C	PA37
S.A-230	S	ICU	I.H	Tehran	AMK, PEN.	C	PA38

Resistance, Intermediate and Susceptible profiles, antibiotics used in current study included: GEN – Gentamicin; AMK – Amikacin; TOB – Tobramycin; RIF – Rifampicin; PEN – Penicillin; OXA – Oxacillin; CIP – Ciprofloxacin; LEV – Levofloxacin; MXF – Moxifloxacin; SXT – Trimethoprim-sulfamethoxazole; TEI – Teicoplanin; CLI – Clindamycin; ERY – Erythromycin; LNZ – Linezolid; CHL – Chloramphenicol; TET – Tetracycline.

Infection Site: B – bloodstream, R – respiratory tract, S – skin and soft tissue, U – urinary tract, C – Catheter, O – others.

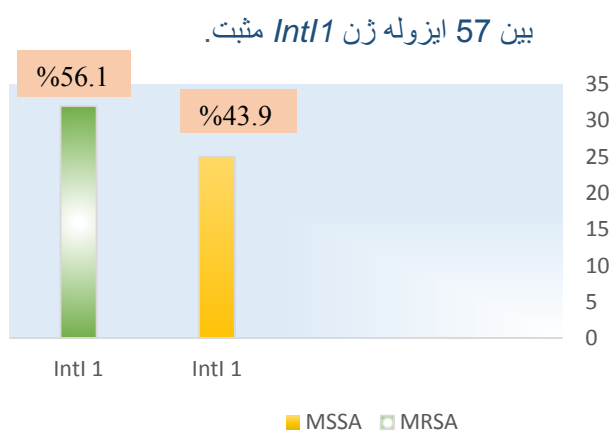
DNA Resources: P – Plasmid; C – Chromosomes / Name of Hospital: SH.R: Shahid Rajaei, I.H: Imam Hussein.

۴-۸-۱ فراوانی ایتنگرون کلاس ۱ در بین ایزوله های MDR و MRSA

جدول ۴-۶. فراوانی ژن *IntI 1* در بین ایزوله های مقاوم به متی سیلین و دارای مقاومت دارویی چندگانه

Frequency rate			Frequency rate		
Integron class 1			Integron class 1		
Isolates N: 230	Positive	Negative	Isolates N: 230	Positive	Negative
MDR N: 141	33 (23.4%)	108 (76.6%)	MRSA N: 136	32 (23.5%)	104 (76.5%)
Non-MDR N: 89	24 (26.9%)	65 (73.1%)	MSSA N: 94	25 (26.6%)	69 (73.4%)

نمودار ۴-۷. فراوانی ایزوله های MRSA و MSSA در بین ۵۷ ایزوله حامل ایتنگرون کلاس ۱



۹-۴ بررسی حضور یا عدم حضور ارتباط آماری حضور ژن با نوع حساسیت آنتی بیوتیک ها

تمامی ایزوله ها از لحاظ بررسی وجود ارتباط معنی دار بین ایزوله های دارای اینتگرون مثبت با نوع حساسیت دیسک های آنتی بیوتیکی طبق جدول (۷-۴) مورد ارزیابی قرار گرفتند. به طوریکه اگر P value آنها از عدد ۰/۰۵ کمتر باشد ($0/05 >$) باشد آن ارتباط از لحاظ آماری معنی دار و قابل قبول می باشد و در غیر این صورت بدون معنی و غیرقابل قبول می باشد.

جدول ۷-۴. پروفایل حساسیت آنتی بیوتیکی برای تمام ایزوله ها، ایزوله های اینتگرون مثبت و اینتگرون منفی و بررسی P value در بین ایزوله های اینتگرون مثبت و منفی

Antibiotic	Antibiotic susceptibility			Integron-positive isolates			Integron-negative isolates			P value
	R (%)	I (%)	S (%)	R (%)	I (%)	S (%)	R (%)	I (%)	S (%)	
GEN	47	1.3	51.7	10.5	0.4	13.9	36.5	0.9	37.8	0.52
AMK	46.1	6.5	47.4	10.9	1.7	12.2	35.2	4.8	35.2	0.88
TOB	47	3.9	49.1	10.5	1.3	13	36.5	2.6	36.1	0.56
RIF	36.5	1.3	62.2	10.4	0.4	13.9	26.1	0.9	48.3	0.41
PEN	97.8	0	2.2	24.3	0	0.4	73.5	0	1.7	0.80
OXA	39.6	3.0	57.4	10.4	0.9	13.5	29.1	2.2	43.9	0.77
CIP	50	6.5	43.5	13.5	1.3	10	36.5	5.2	33.5	0.78
LEV	43.5	3.5	53	12.2	0	12.6	31.3	3.5	40.4	0.22
MXF	42.2	4.3	53.5	11.3	1.3	12.2	30.9	3.0	41.3	0.71
SXT	17	0.4	82.6	3.1	0.4	21.3	13.9	0	61.3	0.15
TEI	4.4	17	78.7	0.9	4.3	19.6	3.5	12.6	59.1	0.93
CLI	37.4	3.9	58.7	10	0.9	13.9	27.4	3.0	44.8	0.88
ERY	45.2	10.9	43.9	12.2	1.3	11.3	33	9.6	32.6	0.31
LNZ	2.6	0	97.4	0.9	0	23.9	1.7	0	73.5	0.63
CHL	3.5	9.6	87	0	21.7	3.0	3.5	6.5	65.2	0.21
TET	58.3	3.0	38.7	14.8	0.9	9.1	43.5	2.2	29.6	0.88

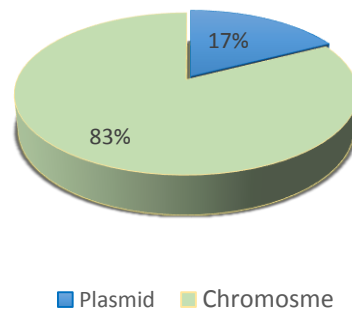
Abbreviations: R – Resistance; I – Intermediate; S – Susceptible; GEN – Gentamicin; AMK – Amikacin; TOB – Tobramycin; RIF – Rifampicin; PEN – Penicillin; OXA – Oxacillin; CIP – Ciprofloxacin; LEV – Levofloxacin; MXF – Moxifloxacin; SXT – Trimethoprim-sulfamethoxazole; TEI – Teicoplanin; CLI – Clindamycin; ERY – Erythromycin; LNZ – Linezolid; CHL – Chloramphenicol; TET – Tetracycline

۴-۱۰ تعیین منشأ ژن اینتگرون کلاس ۱ در ۵۷ ایزوله اینتگرون مثبت

به منظور یافتن منشأ ژن اینتگرون کلاس ۱ در بین ۵۷ ایزوله، PCR سری دوم در این مطالعه انجام پذیرفت. قابل ذکر است برای تمامی ۵۷ ایزوله حاضر استخراج پلازمید انجام گرفته بود. که توزیع فراوانی آنها در نمودار زیر آورده شده است.

نمودار ۴-۵ توزیع منشأ اینتگرون در بین ۵۷ ایزوله حامل اینتگرون کلاس ۱

منشأ اینتگرون



۴-۱۱ نتیجه توالی یابی و ردیف سازی

نتایج تعیین توالی محصولات PCR ژن مورد مطالعه نشان داد که توالی مورد بررسی بعد از blast از تشابه توالی بالایی برخوردار بوده است. نتیجه alignment ژن *IntII* را با یکی از توالی های ثبت شده در NCBI مربوط به باکتری *E.coli* که در سایت از تعداد ارجاع های بالایی نیز برخوردار بود در شکل زیر آورده شده است.

Consensus
	391 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520
In-1	-----
E. coli	GCTGCGGCTTCGGCTGGTCTTTCAGCCACCATGCCGTGCACGCGACAGCTGCTCGCGCAGGCTGGGTGCCAGCTCTCGGGTAACTCAAGGCCCGATCCTTGGAGCCCTTGCCCTCCGCGACGATG
Consensus
	521 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650
In-1	-----
E. coli	ATCGTGCCTGATCGAAATCCAGATCCTTGACCCGAGTTGCAAACTCTCACTGATCCGATGCCGTTCCATACAGAGCTGGGCGAACAAACGATGCTCGCTTCCAGAAAACCGAGGATGCGAACCA
ConsensusGaaaTccaagaCTTGACCCGAGTTGCAAACTCTCACTGATCCGATGCCGTTCCATACAGAGCTGGGCGAACAAACGATGCTCGCTTCCAGAAAACCGAGGATGCGAACCA
	651 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750 760 770 780
In-1	-----
E. coli	CTTCATCCGGGTCAGCACACCGGCAAGCGCCGCGACGGCCGAGGTCTTCGATCTCCTGAGCCAGGGCAGATCCGTGCACAGCACCTTGCCGTAGAGAGACAGCAGGCCCCCATGCTGACGATG
Consensus	CTTCATCCGGGTCAGCACACCGGCAAGCGCCGCGACGGCCGAGGTCTTCGATCTCCTGAGCCAGGGCAGATCCGTGCACAGCACCTTGCCGTAGAGAGACAGCAGGCCCCCATGCTGACGATG
	781 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900 910
In-1	-----
E. coli	CGTGGAGACCGAAACCTTGCGCTCGTTCGCCAGCCAGGACAGAAATGCCTCGACTTCGCTGCTGCCAGGTTGCCGGGTGACGACACCCGTGGAAACGGATGAGGCGACGAACCCAGTGGACATAGCC
Consensus	CGTGGAG.....
	911 920 930 940 950 960 970 980 990 1000 10101014
In-1	-----
E. coli	TGTTCCGTTCTGTAACCTGTATGCAAGTAGCGTATGCGCTCACGCACTGGTCCAGAACCTTGACCGAACGACGCGGTGGTAAACGGCGAGTGGCGGTTTCAT
Consensus

شکل ۴-۴ ردیف سازی به نمونه ژن *IntI1* مثبت.



بخش پنجم

بحث و نتیجه گیری

استافیلوکوکوس/اورئوس بعد از/شرشیا کلی به عنوان دومین عامل ایجاد کننده ی عفونت های بیمارستانی مطرح می باشد که از جمله/استافیلوکوکوس/اورئوس های مقاوم به متی سیلین از معروف ترین و رایج ترین آنها می باشد (۱۲۹). کلینزاسیون این باکتری ها در بینی و دست پرستاران و کارکنان بیمارستان و هم چنین در پرسنل بخش های مراقبت های ویژه به عنوان بیشترین منابع ایزوله های آلوده کننده بیماران بستری مطرح می باشد. در سال های اخیر مرگ و میر بالایی در ارتباط با آن ها در مناطق جغرافیایی مختلف گزارش شده است (۱۳۰). یکی از مشکلات عمده در درمان و پیش گیری از عفونت های ایجاد شده توسط/استافیلوکوکوس/اورئوس، مقاومت این باکتری نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف از قبیل بتالاکتام ها، آمینوگلیکوزید ها، ماکرولیدها و غیره می باشد که این امر موجب گسترش عفونت های ناشی از این باکتری و هم چنین بروز مشکلاتی از قبیل افزایش میزان جراحات وارده به بیماران بستری شده، افزایش هزینه های درمان از طریق نیاز به آنتی بیوتیک های گران قیمت، افزایش مدت زمان بستری بیماران در بیمارستان ها و افزایش هزینه های بیمه های درمانی و از همه مهمتر سبب افزایش میزان مرگ و میر گردیده است که این مسئله پزشکان را جهت درمان عفونت های ناشی/استافیلوکوکوس/اورئوس با محدودیت های بسیاری مواجه کرده است (۱۳۱ و ۱۳۲). یکی از دلایل مهم توسعه وسیع مقاومت های این باکتری در مقابل طیف وسیعی از آنتی بیوتیک ها در رابطه با عناصر ژنتیکی متحرک و انتقال دهنده مقاومت در میان جمعیت های باکتریایی می باشد. به طور عمده این انتقال از طریق چهار مکانیسم اصلی که به ترتیب کنژوگیشن (هم یوغی)، ترانسفورمیشن، کنژوگیشن به وسیله فاژ و ترانس داکشن مطرح می باشد، امروزه به عنوان معضلات درمانی در مراکز درمانی به ویژه بیمارستان ها مطرح است (۱۳۳). حضور هم زمان موتاسیون های ژنی PBP های مسبب بروز فنوتیپ مقاومتی MRSA در سویه

های/استافیلوکوکوس/اورئوس در کنار کاست های ژنی انتقال پذیر کد کننده ژن های مقاومت دارویی به سایر داروهای درمانی (فنوتیپ MDR) از دیگر مشکلات نو ظهور در این باکتری های محسوب می شود (۱۳۴).

یکی از عناصر سیار ژنتیکی مهم اینتگرون ها می باشند. بررسی شیوع اینتگرون ها در سویه های باکتریایی جدا شده از هر کشور به عنوان عوامل موثر در انتشار مقاومت های آنتی بیوتیکی دارای اهمیت می باشد. حضور این عناصر، به ویژه اینتگرون کلاس یک می تواند بر مبنای مطالعات منطقه ای صورت گرفته به عنوان شاهدهی دال بر حضور فنوتیپ مقاوت دارویی مطرح باشد. به استثنای چند مورد، بیشتر مطالعات اپیدمیولوژیک بر روی این عناصر ژنی بر روی باکتری های گرم منفی انجام شده است. و مطالعات کمی برای تعیین حضور اینتگرون ها در باکتری های گرم مثبت به ویژه/استافیلوکوکوس/اورئوس صورت گرفته است (۱۲۱).

لذا بر این اساس بر آن شدیم با مطالعه ی بر روی الگوهای حساسیت آنتی بیوتیکی و تعیین سویه های دارای الگوی مقاوت دارویی چندگانه در بین نمونه های بالینی/استافیلوکوکوس/اورئوس و همچنین تعیین سویه های مقاوم به متی سیلین، وضعیت مقاومت آنتی بیوتیکی را در سویه های/استافیلوکوکوس/اورئوس جدا شده مشخص نموده و همچنین با بهره گرفتن از روش مولکولی PCR حضور کلاس های اینتگرونی ۱، ۲ و ۳ را به عنوان یکی از موثرترین روش های انتقال مقاومت بررسی نماییم.

در این مطالعه ۱۴۱ (۶۱/۳٪) ایزوله از ۲۳۰ ایزوله های/استافیلوکوکوس/اورئوس دارای الگوی دارویی با مقاومت چندگانه بودند. که در بین آنها بیشترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های به ترتیب شامل پنی سیلین (۹۷/۹٪)، تتراسایکلین (۷۹/۴٪)، سیپروفلوکساسین (۷۴/۵٪) و در آنتی بیوتیک های توبرامایسین و جنتامایسین با یک میزان (۷۲/۳٪) نشان داده شد. و در سوی دیگر این مطالعه کمترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک

های لینزولید (۲/۱٪) و کلرامفنیکل (۵/۷٪) گزارش شد. همچنین در مطالعه حاضر از مجموع ۲۳۰ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۱۳۶ ایزوله (۵۹/۱٪) *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین (MRSA) بودند. خوشبختانه در ایران نیز مطالعات زیادی جهت تعیین الگوهای حساسیت آنتی بیوتیکی بر روی ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام شده است که نتایج آنها در مقایسه با مطالعه ما در برخی موارد مشابه و در بعضی جهات متفاوت می باشند. به طور مثال رحیمی و همکاران در سال ۲۰۱۲ طی مطالعه ای انجام گرفته شده بر روی ۲۱۶ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از سه بیمارستان های ارجاعی شهر تهران نشان داد که از این تعداد ۹۳ ایزوله (۴۶٪) آنها دارای الگوی دارویی با مقاومت چندگانه و ۳۰٪ نمونه ها MRSA بودند (۱۳۵). در جدیدترین مطالعه انجام شده در سال ۲۰۱۵ توسط قاسمیان و همکاران در شهر تهران که بر روی ۲۰۹ سوبه *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد که از بین ۶۴ ایزوله مقاوم به متی سیلین ۵۶٪ ایزوله های آن دارای الگوی MDR بودند (۱۳۶). در مطالعه ی دیگر که اخیراً توسط دیبا و همکاران در شهر اردبیل انجام گرفت نشان داد که فراوانی ایزوله های MRSA، ۴۶/۳٪ بود که این ایزوله ها از دو بیمارستان آموزشی شهر اردبیل جدا شده بودند (۱۳۷). همچنین در مطالعه ی دیگر در ایران که توسط سید جواد و همکاران در سال ۲۰۱۴ انجام پذیرفت نشان داد که ۴۶/۲٪ از ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* آنها دارای الگوی مقاومت دارویی چندگانه بودند (۱۱۸). نتایج مطالعه ی ما از لحاظ بررسی میزان حضور MRSA و MDR نسبت به چهار مطالعه ی قبلی عنوان شده از میزان شیوع بالاتری برخوردار است. اما نسبت به مطالعه رضایی و همکاران که در سال ۲۰۱۳ در شهر اراک انجام شد، نشان داد که از ۱۰۰ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۸۰ (۸۰٪) ایزوله آنها توانستند مقاومت به متی سیلین را هم به روش فنوتیپی و هم به روش ژنوتیپی از خود نشان دهند. از اینرو مطالعه فعلی ما در مقایسه با آن دارای میزان شیوع پایین تری می باشد (۱۳۸).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ۵۷ (۲۴/۸٪) ایزوله از ۲۳۰ ایزوله /استافیلوکوکوس اورئوس حامل ژن *IntII* بودند. و فراوانی این ژن بین سویه های MRSA، ۲۳/۵٪ و بین ایزوله های MDR، ۲۳/۴٪ می باشد.

برخلاف مطالعات وسیع انجام گرفته در بین باکتری های گرم منفی، گزارش های زیادی در بین باکتری های گرم مثبت وجود ندارد. اما با این وجود در دو الی سه سال اخیر توجهات زیادی به حضور کلاس های اینتگرون در /استافیلوکوکوس اورئوس شده است. در کشور ما ایران سید جواد و همکاران طی مطالعه ای در تهران در سال ۲۰۱۴ بر روی ۱۰۸ ایزوله /استافیلوکوکوس اورئوس، مشخص نمودند که ۳۱ ایزوله (۲۸/۷٪) آن از نظر حضور ژن *intII* مثبت بودند (۱۱۸). در مطالعه دیگری از ایران که پرستو ویسه و همکارانش بر روی ۲۰۰ ایزوله استافیلوکوکوس جدا شده از بیمارستان های شهر سنج، استان کردستان انجام دادند، نشان داد که از بین ۹۰ ایزوله /استافیلوکوکوس اورئوس ۳۷ (۴۰/۱٪) ایزوله /استافیلوکوکوس اورئوس دارای ژن *IntII* بودند (۱۱۹).

در تازه ترین مطالعه ای که در تهران توسط یاحقی و همکارانش بر روی ۲۰۰ ایزوله /استافیلوکوکوس اورئوس صورت پذیرفت، نشان داد که تنها ۲ ایزوله (۱٪) حامل این ژن بودند (۱۳۹). همانطور که مشخص است نتایج اعلام شده در ایران در مقایسه با نتایج مطالعه حال حاضر در برخی موارد از درصد بالاتر و در برخی موارد از درصد پایین تری برخوردار است. اما در سایر کشورها دامنه این تغییرات گسترده تر و دارای طیف وسیع تری می باشد. در کشور چین که طبق دانسته ما جزء آغازگران مطالعه کلاس های اینتگرونی بر روی استافیلوکوک ها بودند. چندین گزارش وجود دارد که از جمله Xu و همکاران در سال های ۲۰۰۶-۲۰۰۱ و ۲۰۰۷ در دو مطالعه جداگانه نشان داد که در مطالعه ی اول از ۱۷۹ ایزوله /استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA)، ۷۶ (۴۲/۵٪) از آنها دارای اینتگرون کلاس ۱ و در مطالعه دوم از بین ۳۰ ایزوله /استافیلوکوکوس اورئوس، ۱۶ (۵۳٪) ایزوله دارای این ژن بودند (۱۲۱ و ۱۲۲). در سال ۲۰۱۳ در کشور چین، Ren و همکارانش

مطالعه ای بر روی ۱۸۰ ایزوله بیمارستانی /استافیلوکوکوس اورئوس انجام دادند، که ۹۲ (۵۱/۱۱٪) و ۷۱ (۳۹/۴۴٪) ایزوله آنها به ترتیب دارای اینتگرون کلاس ۱ با منشاء DNA پلاسمیدی و DNA کروموزومی بودند. در کشور هند در سال ۲۰۱۵ مطالعه ای توسط ماراته و همکارانش انجام شد فراوانی کلاس یک اینتگرون در بین ایزوله های MRSA جدا شده ۷۱٪ گزارش کردند که از تعداد ۱۴۳ ایزوله های MRSA، ۱۰۱ ایزوله دارای این ژن بودند (۱۲۰). در این مطالعه از آنجایی که هیچ یک از ایزوله های مورد بررسی از نظر حضور ژن *IntI2* و *IntI3* مثبت نبودند، لذا اینطور می توان نتیجه گرفت که هنوز شیوع دیگر کلاس های اینتگرونی به غیر از *IntI1* در /استافیلوکوکوس اورئوس حداقل در دو شهر ایران شایع نشده است اما در مطالعه Ren و همکاران ژن *IntI2* در بین ایزوله های مورد مطالعه دارای فراوانی ۱۸/۶۶٪ بود و یافته ای قابل توجه در نظر گرفته می شود. بر خلاف انتظار ما در این مطالعه هیچ گونه ارتباط معنی داری بین حضور اینتگرون کلاس یک با فنوتیپ های حساسیت دیسک های آنتی بیوتیکی در ۵۷ ایزوله یافت نشد یا به عبارتی دیگر P value تمامی ۱۶ دیسک نام برده شده در جدول ۴-۷ بزرگتر از عدد ۰/۰۵ بودند که اینطور به نظر می رسد بیشتر ایزوله های مورد مطالعه فاقد کاست های ژنی مورد نظر بر روی کلاس اینتگرونی ۱ خود می باشند و مکانیسم های دیگری در بروز مقاومت دخیل می باشند.

منشاء قرارگیری اینتگرون ها می تواند پلاسمیدی یا کروموزومی باشد که بر اساس این مطالعه حضور ژن *IntI1* بر روی کروموزوم نسبت به پلاسمید بیشتر بوده است به طوری ۸۲/۵٪ اینتگرون کلاس ۱ دارای منشاء کروموزومی و ۱۷/۵٪ منشاء پلازمیدی بودند که این یافته نسبت به مطالعه Ren و همکاران دارای مغایرت می باشد زیرا در مطالعه آنها ۵۱/۱۱٪ از اینتگرون ها منشاء پلازمیدی و ۳۹/۴۴٪ منشاء کروموزومی بودند (۱۲۳). تفاوت های موجود بین نتایج حاصل از این مطالعه با دیگر مطالعات انجام گرفته در کشور ما و سایر نقاط جهان

دلیلی بر تفاوت در فراوانی و شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی در بین کشورهای مختلف، بیمارستان های متفاوت و حتی بخش های بیمارستانی و حتی بین افراد یک جمعیت می باشند که می تواند مرتبط با میزان مصرف آنتی بیوتیکی غیر منطقی آن در این مناطق از جمله ایران باعث بروز مکانیسم های مختلف مقاومت و فشار انتخابی در محیط شده است. با توجه با اینکه میزان فراوانی ژن ایتنگرون کلاس یک در مطالعه ما در بین ایزوله های MRSA و MSSA از تفاوت قابل ملاحظه ای برخوردار نیست. و در بین ۵۷ ایزوله ژن *int11* مثبت تقریباً دارای توزیع یکسانی می باشند اما همین میزان فراوانی ۲۳/۵٪ در بین MRSA از اهمیت زیادی برخوردار می باشد زیرا با در نظر گرفتن حضور همزمانی کاست های کروموزومی SCCmec و همچنین کاست های ژنی مقاوم بر روی ایتنگرون که مکان قرارگیری آنها هم می تواند هم بر روی پلازمید و یا روی کروموزوم باکتری باشد قدرت مقابله این سویه ها از *استافیلوکوکوس/ورئوس* را در مقابل طیف وسیعی از داروها افزایش داده و قطعاً در آینده مشکلات درمانی و هزینه های بیماران را دچار چالش بیشتر از پیش خواهد کرد.

۵-۲ نتیجه گیری

افزایش سویه های *استافیلوکوکوس/ورئوس* دارای الگوهای MDR و سویه های MRSA نگرانی های سلامت جامعه و مراکز بهداشت و درمان را چندین برابر کرده است. زیرا باعث شکست درمان می شوند و یا حداقل به راحتی به درمان آنتی بیوتیکی پاسخ نمی دهند. همچنین حضور کلاس های ایتنگرونی در این گروه از باکتری ها نیز اهمیت این موضوع را تایید می کند زیرا این کلاس ها توانایی حمل کاست های ژنی مقاوم به گروه های مختلف آنتی بیوتیکی را دارا می باشند. در صورت افزایش فراوانی سویه های MRSA دارای ایتنگرون کلاس یک و کلاس های دیگر در آینده نزدیک، باید به صورت جدی سیاست های لازم به منظور کنترل و پیشگیری از افزایش آنها در نظر گرفته شود.

بنابراین پیشنهاد می شود که در آینده تحقیقات جامعی بر روی یافتن کاست های ژنی احتمالی بر روی کلاس های ایتتگرونی در /ستافیلوکوکوس/ورئوس انجام پذیرد زیرا هنوز مطالعات گسترده و یکپارچه ای در مقایسه با باکتری های گرم منفی صورت نگرفته است. در واقع برای درک بهتر مفاهیم عناصر متحرک ژنتیکی به اطلاعات بیشتری درباره این موضوعات نیازمندایم. زیرا مطالعه دقیق تر ایتتگرون ها و کاست های ژنی مقاومت دارویی حمل شونده توسط آن ها می تواند اطلاعات مهمی را در مورد مکانیسم های کسب ژن های مقاومت چندگانه در این ایزوله ها به منظور انتخاب رژیم درمانی آنتی بیوتیکی موثر و کنترل عفونت های ناشی از آن ها ارائه نماید. همچنین با توجه به ظهور ایتتگرون ها و نقش آنان در انتشار مقاومت های آنتی بیوتیکی در باکتری ها بهتر است در بازده های زمانی مختلف شیوع ایتتگرون ها در باکتری های گرم مثبت مورد بررسی قرار گیرد.

1. Tomovic S, Friedel ME, Liu JK, Eloy JA. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skull base osteomyelitis with occipital condylar cerebrospinal fluid leak in an immunocompetent patient. *The Laryngoscope*. 2012;122:977-81.
2. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of clinical microbiology*. 1995;33:2233-9.
3. Kikuchi K, Takahashi N, Piao C, Totsuka K, Nishida H, Uchiyama T. Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Causing Neonatal Toxic Shock Syndrome-Like Exanthematous Disease in Neonatal and Perinatal Wards. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41:3001-6.
4. Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2007;298:1763-71.
5. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of clinical investigation*. 2003;111:1265-73.
6. Ren C, Zhao Y, Shen Y. Analysis of the effect of integrons on drug-resistant *Staphylococcus aureus* by multiplex PCR detection. *Molecular medicine reports*. 2013;7:719-24.
7. Xu Z, Li L, Shi L, Shirtliff ME. Class 1 integron in staphylococci. *Molecular biology reports*. 2011;38:5261-79.
8. Parasto V. Identification of Class I Integrons Gene in *Staphylococcus* Strains

Isolated from Clinical Samples. *Cell Biology*. 2013;1:24-7.

9. Severino P, Magalhaes VD. Integrins as tools for epidemiological studies. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2004;10:156-62.

10. Topley WWC, Wilson GSS, Mahy BWJ. Topley & Wilson's microbiology & microbial infections. 10th ed. / edited by Brian W.J. Mahy ... [et al.]. ed. London: Hodder Arnold; 2005.

11. Harris LG, Foster SJ, Richards RG. An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. *European cells & materials*. 2002;4:39-60.

12. Murray PR, Baron EJ. *Manual of clinical microbiology*. 9th ed. Washington, D.C.: ASM Press; 2007.

13. Versalovic J, American Society for Microbiology. *Manual of clinical microbiology*. 10th ed. Washington, DC: ASM Press; 2011.

14. Brooks GF, Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology. 25th ed. ed. New York, N.Y.: McGraw-Hill Medical; 2010.

15. Otto M. *Staphylococcus* colonization of the skin and antimicrobial peptides. *Expert review of dermatology*. 2010;5:183-95.

16. Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. *Textbook of diagnostic microbiology*. 4th ed. Maryland Heights, Mo.: Saunders/Elsevier; 2011. xvii, 1080 p. p.

17. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical microbiology*. 7th Edition ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders; 2013. x, 874 pages p.

18. Patricia TM. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 2013.

19. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS, Bailey WRDm. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*. 12th ed. ed. St. Louis, Mo. ; London: Elsevier Mosby; 2007.

20. Melter O, Radojevic B. Small colony variants of *Staphylococcus aureus*--review. *Folia microbiologica*. 2010;55:548-58.

21. Tubby S, Wilson M, Wright JA, Zhang P, Nair SP. Staphylococcus aureus small colony variants are susceptible to light activated antimicrobial agents. BMC microbiology. 2013;13:201.
22. Bhattacharyya S, Roy S, Mukhopadhyay P, Rit K, Dey J, Ganguly U, et al. Small Colony variants of Staphylococcus aureus isolated from a patient with infective endocarditis: a case report and review of the literature. Iranian journal of microbiology. 2012;4:98-9.
23. Cho JI, Jung HJ, Kim YJ, Park SH, Ha SD, Kim KS. Detection of methicillin resistance in Staphylococcus aureus isolates using two-step triplex PCR and conventional methods. Journal of microbiology and biotechnology. 2007;17:673-6.
24. Bannerman TL, Hancock GA, Tenover FC, Miller JM. Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of Staphylococcus aureus. Journal of clinical microbiology. 1995;33:551-5.
25. Blanc DS, Struelens MJ, Deplano A, De Ryck R, Hauser PM, Petignat C, et al. Epidemiological validation of pulsed-field gel electrophoresis patterns for methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Journal of clinical microbiology. 2001;39:3442-5.
26. Koren L, Ramaswamy SV, Graviss EA, Naidich S, Musser JM, Kreiswirth BN. spa typing method for discriminating among Staphylococcus aureus isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation. Journal of clinical microbiology. 2004;42:792-9.
27. Bohme K, Morandi S, Cremonesi P, Fernandez No IC, Barros-Velazquez J, Castiglioni B, et al. Characterization of Staphylococcus aureus strains isolated from Italian dairy products by MALDI-TOF mass fingerprinting. Electrophoresis. 2012;33:2355-64.
28. Mehndiratta PL, Bhalla P, Ahmed A, Sharma YD. Molecular typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains by PCR-RFLP of SPA gene: a

- reference laboratory perspective. Indian journal of medical microbiology. 2009;27:116-22.
29. Shopsin B, Gomez M, Waddington M, Riehman M, Kreiswirth BN. Use of coagulase gene (coa) repeat region nucleotide sequences for typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Journal of clinical microbiology. 2000;38:3453-6.
30. Sabat A, Krzyszton-Russjan J, Strzalka W, Filipek R, Kosowska K, Hryniewicz W, et al. New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. Journal of clinical microbiology. 2003;41:1801-4.
31. Bien J, Sokolova O, Bozko P. Characterization of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*: Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response. Journal of pathogens. 2011;2011:601905.
32. Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Hook M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. Annual review of microbiology. 1994;48:585-617.
33. Roche FM, Massey R, Peacock SJ, Day NP, Visai L, Speziale P, et al. Characterization of novel LPXTG-containing proteins of *Staphylococcus aureus* identified from genome sequences. Microbiology (Reading, England). 2003;149:643-54.
34. Fischetti VA, Pancholi V, Schneewind O. Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from gram-positive cocci. Molecular microbiology. 1990;4:1603-5.
35. Novick RP. Mobile genetic elements and bacterial toxinoses: the superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. Plasmid. 2003;49:93-105.
36. Novick RP, Schlievert P, Ruzin A. Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. Microbes and infection / Institut Pasteur. 2001;3:585-94.

37. Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki K, Oguchi A, et al. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet*. 2002;359:1819-27.
38. O'Riordan K, Lee JC. Staphylococcus aureus capsular polysaccharides. *Clinical microbiology reviews*. 2004;17:218-34.
39. Nanra JS, Buitrago SM, Crawford S, Ng J, Fink PS, Hawkins J, et al. Capsular polysaccharides are an important immune evasion mechanism for Staphylococcus aureus. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2013;9:480-7.
40. Dmitriev BA, Toukach FV, Holst O, Rietschel ET, Ehlers S. Tertiary structure of Staphylococcus aureus cell wall murein. *Journal of bacteriology*. 2004;186:7141-8.
41. Majcherczyk PA, Rubli E, Heumann D, Glauser MP, Moreillon P. Teichoic acids are not required for Streptococcus pneumoniae and Staphylococcus aureus cell walls to trigger the release of tumor necrosis factor by peripheral blood monocytes. *Infection and immunity*. 2003;71:3707-13.
42. Foster TJ, Hook M. Surface protein adhesins of Staphylococcus aureus. *Trends in microbiology*. 1998;6:484-8.
43. Signas C, Raucci G, Jonsson K, Lindgren PE, Anantharamaiah GM, Hook M, et al. Nucleotide sequence of the gene for a fibronectin-binding protein from Staphylococcus aureus: use of this peptide sequence in the synthesis of biologically active peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86:699-703.
44. Guss B, Uhlen M, Nilsson B, Lindberg M, Sjoquist J, Sjudahl J. Region X, the cell-wall-attachment part of staphylococcal protein A. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1984;138:413-20.
45. Uhlen M, Guss B, Nilsson B, Gatenbeck S, Philipson L, Lindberg M. Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. A gene evolved through

multiple duplications. *The Journal of biological chemistry*. 1984;259:1695-702.

46. Brigido Mde M, Barardi CR, Bonjardin CA, Santos CL, Junqueira ML, Brentani RR. Nucleotide sequence of a variant protein A of *Staphylococcus aureus* suggests molecular heterogeneity among strains. *Journal of basic microbiology*. 1991;31:337-45.

47. Olson ME, Nygaard TK, Ackermann L, Watkins RL, Zurek OW, Pallister KB, et al. *Staphylococcus aureus* nuclease is an SaeRS-dependent virulence factor. *Infection and immunity*. 2013;81:1316-24.

48. Neslihan GÜ N, Aslı D. Protease And Lipase Activity Of *Staphylococcus Aureus* Obtained From Meat, Chicken And Meatball Samples. *GAZI UNIVERSITY JOURNAL OF SCIENCE*; Vol 23, No 4 (2010). 2010.

49. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology reviews*. 2000;13:16-34, table of contents.

50. Goldman E, Green LH. *Practical handbook of microbiology*. 2nd ed. ed. Boca Raton, Fla. ; London: CRC Press; 2009.

51. Monecke S, Berger-Bachi B, Coombs G, Holmes A, Kay I, Kearns A, et al. Comparative genomics and DNA array-based genotyping of pandemic *Staphylococcus aureus* strains encoding Panton-Valentine leukocidin. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2007;13:236-49.

52. Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, Dolin R. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 6th ed. ed. Philadelphia, Pa.: Elsevier/Churchill Livingstone; 2005.

53. McCormick JK, Yarwood JM, Schlievert PM. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annual review of microbiology*. 2001;55:77-104.

54. Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. *International journal of food microbiology*. 2000;61:1-10.

55. Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, et al. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1999;29:1128-32.
56. Williams RJ, Ward JM, Henderson B, Poole S, O'Hara BP, Wilson M, et al. Identification of a novel gene cluster encoding staphylococcal exotoxin-like proteins: characterization of the prototypic gene and its protein product, SET1. *Infection and immunity*. 2000;68:4407-15.
57. Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, et al. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 2001;357:1225-40.
58. Bukowski M, Wladyka B, Dubin G. Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins*. 2010;2:1148-65.
59. Ladhani S, Joannou CL, Lochrie DP, Evans RW, Poston SM. Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. *Clinical microbiology reviews*. 1999;12:224-42.
60. Nagao M, Okamoto A, Yamada K, Hasegawa T, Hasegawa Y, Ohta M. Variations in amount of TSST-1 produced by clinical methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates and allelic variation in accessory gene regulator (*agr*) locus. *BMC microbiology*. 2009;9:52.
61. Lindsay JA, Ruzin A, Ross HF, Kurepina N, Novick RP. The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. *Molecular microbiology*. 1998;29:527-43.
62. Fitzgerald JR, Reid SD, Ruotsalainen E, Tripp TJ, Liu M, Cole R, et al. Genome diversification in *Staphylococcus aureus*: Molecular evolution of a highly variable chromosomal region encoding the Staphylococcal exotoxin-like family of proteins. *Infection and immunity*. 2003;71:2827-38.

63. Ulrich RG. Evolving superantigens of *Staphylococcus aureus*. FEMS immunology and medical microbiology. 2000;27:1-7.
64. Kaneko J, Kimura T, Narita S, Tomita T, Kamio Y. Complete nucleotide sequence and molecular characterization of the temperate staphylococcal bacteriophage phiPVL carrying Panton-Valentine leukocidin genes. Gene. 1998;215:57-67.
65. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2000;44:1549-55.
66. Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy. 2003;6:41-52.
67. Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2001;45:1323-36.
68. Ma XX, Ito T, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chongtrakool P, Boyle-Vavra S, et al. Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2002;46:1147-52.
69. Wielders CL, Vriens MR, Brisse S, de Graaf-Miltenburg LA, Troelstra A, Flier A, et al. In-vivo transfer of mecA DNA to *Staphylococcus aureus* [corrected]. Lancet. 2001;357:1674-5.
70. Mayhall CG. Hospital epidemiology and infection control. 3rd ed. ed. Philadelphia, Pa. ; London: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
71. Zhanel GG, DeCorby M, Laing N, Weshnoweski B, Vashisht R, Tailor F, et al.

Antimicrobial-resistant pathogens in intensive care units in Canada: results of the Canadian National Intensive Care Unit (CAN-ICU) study, 2005-2006. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52:1430-7.

72. Lin MY, Hayden MK. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococcus: recognition and prevention in intensive care units. *Critical care medicine*. 2010;38:S335-44.

73. Guilfoile P, Alcamo IE. Antibiotic-resistant bacteria. New York: Chelsea House; 2007. 128 p. p.

74. Askari E, Soleymani F, Arianpoor A, Tabatabai SM, Amini A, Naderinasab M. Epidemiology of *mecA*-Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Iran: A Systematic Review and Meta-analysis. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2012;15:1010-9.

75. Graves SF, Kobayashi SD, DeLeo FR. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* immune evasion and virulence. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2010;88:109-14.

76. Ghaznavi-Rad E, Nor Shamsudin M, Sekawi Z, van Belkum A, Neela V. A simplified multiplex PCR assay for fast and easy discrimination of globally distributed staphylococcal cassette chromosome *mec* types in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of medical microbiology*. 2010;59:1135-9.

77. Turlej A, Hryniewicz W, Empel J. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (*Scmec*) classification and typing methods: an overview. *Polish journal of microbiology / Polskie Towarzystwo Mikrobiologow = The Polish Society of Microbiologists*. 2011;60:95-103.

78. Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature reviews Microbiology*. 2009;7:629-41.

79. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical*

microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2007;13:222-35.

80. Mylotte JM, Tayara A. Staphylococcus aureus bacteremia: predictors of 30-day mortality in a large cohort. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2000;31:1170-4.

81. Kotra LP, Haddad J, Mobashery S. Aminoglycosides: Perspectives on Mechanisms of Action and Resistance and Strategies to Counter Resistance. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2000;44:3249-56.

82. Charbonneau P, Parienti JJ, Thibon P, Ramakers M, Daubin C, du Cheyron D, et al. Fluoroquinolone use and methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolation rates in hospitalized patients: a quasi experimental study. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2006;42:778-84.

83. Sato T, Tateda K, Kimura S, Iwata M, Ishii Y, Yamaguchi K. In vitro antibacterial activity of modithromycin, a novel 6,11-bridged bicycclolide, against respiratory pathogens, including macrolide-resistant Gram-positive cocci. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2011;55:1588-93.

84. Siberry GK, Tekle T, Carroll K, Dick J. Failure of clindamycin treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus expressing inducible clindamycin resistance in vitro. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2003;37:1257-60.

85. Jacoby GA. Mechanisms of Resistance to Quinolones. Clinical Infectious Diseases. 2005;41:S120-S6.

86. Hashem RA, Yassin AS, Zedan HH, Amin MA. Fluoroquinolone resistant mechanisms in methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical isolates in Cairo, Egypt. Journal of infection in developing countries. 2013;7:796-803.

87. Aligholi M, Mirsalehian A, Halimi S, Imaneini H, Taherikalani M, Jabalameli F,

et al. Phenotypic and genotypic evaluation of fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in Tehran. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2011;17:Ph71-4.

88. Schmitz F-J, Krey A, Sadurski R, Verhoef J, Milatovic D, Fluit AC, et al. Resistance to tetracycline and distribution of tetracycline resistance genes in European *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2001;47:239-40.

89. O'Neill A, Oliva B, Storey C, Hoyle A, Fishwick C, Chopra I. RNA polymerase inhibitors with activity against rifampin-resistant mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2000;44:3163-6.

90. Goldman E, Green LH. *Practical handbook of microbiology*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2009. xx, 853 p. p.

91. Brock TD, Madigan MT. *Biology of microorganisms*. 5th ed / Thomas D. Brock, Michael T. Madigan. ed: Prentice Hall International; 1988.

92. de Jonge BLM, Tomasz A. Abnormal Peptidoglycan Produced in a Methicillin-Resistant Strain of *Staphylococcus aureus* Grown in the Presence of Methicillin: Functional Role for Penicillin-Binding Protein 2A in Cell Wall Synthesis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1993;37:342-6.

93. Bigelow N, Ng LK, Robson HG, Dillon JR. Strategies for molecular characterisation of methicillin- and gentamicin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Canadian nosocomial outbreak. *Journal of medical microbiology*. 1989;30:51-8.

94. Jawetz E, Adelberg EA, Melnick JL. *Review of medical microbiology*. . Los Altos: Lange Medical Publications; 1966.

95. LACEY RW. ANTIBIOTIC RESISTANCE IN STAPHYLOCOCCUS AUREUS AND STREPTOCOCCI. *British Medical Bulletin*. 1984;40:77-83.

96. Simor AE. Containing methicillin-resistant *S aureus*. *Surveillance, control, and treatment methods*. *Postgraduate medicine*. 2001;110:43-8; quiz 11.

97. Schmitt R. Molecular biology of transposable elements. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1986;18 Suppl C:25-34.
98. Rountree PM. History of staphylococcal infection in Australia. *The Medical journal of Australia*. 1978;2:543-6.
99. Townsend DE, Bolton S, Ashdown N, Taheri S, Grubb WB. Comparison of phage-mediated and conjugative transfer of staphylococcal plasmids in vitro and in vivo. *Journal of medical microbiology*. 1986;22:107-14.
100. Sabath LD, Laverdiere M, Wheeler N, Blazevec D, Wilkinson B. A NEW TYPE OF PENICILLIN RESISTANCE OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS. *The Lancet*. 309:443-7.
101. el Solh N, Allignet J, Bismuth R, Buret B, Fouace JM. Conjugative transfer of staphylococcal antibiotic resistance markers in the absence of detectable plasmid DNA. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1986;30:161-9.
102. Townsend DE, Ashdown N, Momoh M, Grubb WB. Distribution of plasmid-borne resistance to nucleic acid binding compounds in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1985;15:417-34.
103. Townsend DE, Ashdown N, Greed LC, Grubb WB. Transposition of gentamicin resistance to staphylococcal plasmids encoding resistance to cationic agents. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1984;14:115-24.
104. Livermore DM. Antibiotic resistance in staphylococci. *International journal of antimicrobial agents*. 2000;16 Suppl 1:S3-10.
105. Naidoo J. Interspecific co-transfer of antibiotic resistance plasmids in staphylococci in vivo. *The Journal of Hygiene*. 1984;93:59-66.
106. Ubelaker MH, Rosenblum ED. Transduction of plasmid determinants in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*. 1978;133:699-707.
107. Xu Z, Li L, Shi L, Shirtliff M. Class 1 integron in staphylococci. *Molecular*

biology reports. 2011;38:5261-79.

108. Bennett PM. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British journal of pharmacology*. 2008;153 Suppl 1:S347-57.

109. Rowe-Magnus DA, Mazel D. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *International journal of medical microbiology : IJMM*. 2002;292:115-25.

110. Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature Reviews Microbiology*. 2006;4:608-20.

111. Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Kugler K. Bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infection: frequencies of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY antimicrobial surveillance program (United States and Canada, 1997). *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1998;42:1762-70.

112. Fluit AC, Schmitz FJ, Verhoef J. Frequency of isolation of pathogens from bloodstream, nosocomial pneumonia, skin and soft tissue, and urinary tract infections occurring in European patients. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2001;20:188-91.

113. Rubin RJ, Harrington CA, Poon A, Dietrich K, Greene JA, Moiduddin A. The economic impact of *Staphylococcus aureus* infection in New York City hospitals. *Emerging infectious diseases*. 1999;5:9-17.

114. Jensen AG, Wachmann CH, Espersen F, Scheibel J, Skinhoj P, Frimodt-Moller N. Treatment and outcome of *Staphylococcus aureus* bacteremia: a prospective study of 278 cases. *Archives of internal medicine*. 2002;162:25-32.

115. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clinical*

infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2003;36:53-9.

116. Shakeri F, Shojai A, Golalipour M, Rahimi Alang S, Vaez H, Ghaemi EA. Spa Diversity among MRSA and MSSA Strains of *Staphylococcus aureus* in North of Iran. *International journal of microbiology*. 2010;2010.

117. Salasia SIO KZ, Lammler C, Nirwati H. Pheno- and genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from human skin infections in Yogyakarta. *Indonesian Journal Of Biotechnology*. 2003;22:612-20.

118. Seyed javadi SS, Alebouyeh M, Nazem Alhosseini Mojarad E, Zali MR. Frequency of class 1 integron and multidrug resistance pattern among isolates of *Staphylococcus aureus* from hospitalized patients and environmental samples in an intensive care unit in Tahrán, Iran. *koomesh*. 2014;15:341-8.

119. Parasto Veise RR, Zahra Dailami Khiababi, Bahare Derakhshi, Nour Amirmozafari. Identification of class I integrons gene in *staphylococcus* strains isolated from clinical samples. *Cell Biology*. 2013;1:24-7.

120. Marathe NP, Nagarkar SS, Vaishampayan AA, Rasane MH, Samant SA, Dohe V, et al. High prevalence of class 1 integrons in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from India. *Indian journal of medical microbiology*. 2015;33:231-6.

121. Xu Z, Li L, Shirliff ME, Peters BM, Li B, Peng Y, et al. Resistance class 1 integron in clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in southern China, 2001-2006. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2011;17:714-8.

122. Xu Z, Shi L, Zhang C, Zhang L, Li X, Cao Y, et al. Nosocomial infection caused by class 1 integron-carrying *Staphylococcus aureus* in a hospital in South China. *Clinical Microbiology and Infection*. 2007;13:980-4.

123. Ren C, Zhao Y, Shen Y. Analysis of the effect of integrons on drug-resistant *Staphylococcus aureus* by multiplex PCR detection. *Molecular medicine reports*. 2013;7:719-24.
124. Liu H, Wang H, Huang M, Mei Y, Gu B, Wu R, et al. Analysis of antimicrobial resistance and class 1 integrons among strains from upper respiratory tract of healthy adults. *Journal of thoracic disease*. 2013;5:149-55.
125. Xu Z, Li L, Shirliff ME, Peters BM, Peng Y, Alam MJ, et al. First report of class 2 integron in clinical *Enterococcus faecalis* and class 1 integron in *Enterococcus faecium* in South China. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2010;68:315-7.
126. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2012;18:268-81.
127. Thong KL, Lai MY, Teh CS, Chua KH. Simultaneous detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* by multiplex PCR. *Tropical biomedicine*. 2011;28:21-31.
128. Xiao-min X, You-fen F, Wei-yun F, Zu-huang M, Xing-bei W. Antibiotic resistance determinants of a group of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in China. *J Antibiot*. 2014;67:439-44.
129. Jarvis WR, Martone WJ. Predominant pathogens in hospital infections. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1992;29 Suppl A:19-24.
130. Shibabaw A, Abebe T, Mihret A. Nasal carriage rate of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* among Dessie Referral Hospital Health Care Workers; Dessie, Northeast Ethiopia. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*.

2013;2:25.

131. Sharma Y, Jain S, Singh H, Govil V. Staphylococcus aureus: Screening for Nasal Carriers in a Community Setting with Special Reference to MRSA. Scientifica. 2014;2014:5.

132. Rasmussen RV, Fowler VG, Skov R, Bruun NE. Future challenges and treatment of Staphylococcus aureus bacteremia with emphasis on MRSA. Future microbiology. 2011;6:43-56.

133. Davies J, Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR. 2010;74:417-33.

134. David MZ, Daum RS. Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic. Clinical microbiology reviews. 2010;23:616-87.

135. Rahimi F, Bouzari M, Katouli M, Pourshafie MR. Antibiotic Resistance Pattern of Methicillin Resistant and Methicillin Sensitive Staphylococcus aureus Isolates in Tehran, Iran. Jundishapur J Microbiol. 2013;6:144-9.

136. Ghasemian A, Najar Peerayeh S, Bakhshi B, Mirzaee M. Several Virulence Factors of Multidrug-Resistant Staphylococcus aureus Isolates From Hospitalized Patients in Tehran. Int J Enteric Pathog. 2015;3:e25196.

137. Dibah S, Arzanlou M, Jannati E, Shapouri R. Prevalence and antimicrobial resistance pattern of methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strains isolated from clinical specimens in Ardabil, Iran. Iranian journal of microbiology. 2014;6:163-8.

138. Rezazadeh M, Yousefi Mashouf R, sarmadyan H, Ghaznavi-Rad E. Antibiotic profile of methicillin-resistant Staphylococcus aureus with multiple-drug resistances isolated from nosocomial infections in Vali-Asr Hospital of Arak. Arak University of Medical Sciences Journal. 2013;16:29-37.

139. Yahaghi E, Imani Fooladi AA, Amin M, Mirnejad R, Nezamzade R, Amani J.

Detection of Class I Integrons in *Staphylococcus aureus* Isolated From Clinical Samples. Iranian Red Crescent medical journal. 2014;16:e16234.

ضمیمه

❖ پلاسمای خرگوش :

به پلاسمای لیوفلیزه (سیگما، آلمان) ۲ میلی لیتر سرم فیزیولوژی اضافه کرده و پس از آن قابل استفاده است.

❖ 3% H₂O₂ :

برای ساخت ۲۰۰ میلی لیتر آب اکسیژنه ۳ درصد، ۵ میلی لیتر آب اکسیژنه (۳۵ درصد) را به ۱۹۵ میلی لیتر آب مقطر اضافه کرده و محلول را درفویل پوشانده و در تاریکی نگاه می داریم.

❖ 1N HCL :

برای تهیه ۱۰۰ میلی لیتر اسیدکلریدریک نرمال مقدار ۱۱/۹ میلی لیتر اسید (۳۸-۳۶/۵ درصد) را به ۸۸/۱ میلی لیتر آب مقطر اضافه می کنیم. این عمل در بالن ژوژه صورت می گیرد تا اسید به بیرون نپاشد. هم چنین باید توجه شود که اسید را به آهستگی به آب اضافه شود .

❖ محیط مولر هینتون آگار دارای ۴ درصد نمک و پودراگزاسیلین

۴ گرم نمک را به ازای هر میلی گرم مولر هینتون در محیط کشت حل شده و سپس اتوکلاو می گردد . پس از اتوکلاو شدن و سرد شدن محیط تادمای تقریبی ۵۰ - ۴۵ درجه سانتیگراد ۶ میلی گرم پودر حل شده اگزاسیلین را توسط فیلتر به هر ۱۰۰۰ میلی لیتر محیط مولر هینتون اضافه می کنیم.

❖ 10X TE buffer :

۲/۴۲ گرم تریس (10 mM) را در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و سپس ۰/۷۴ گرم EDTA (1 mM) به آن اضافه کرده و به آرامی مخلوط می نماییم . با اسید کلریدریک یک نرمال (1N) pH برابر ۸ شده و در نهایت

حجم کلی را به ۲۰ میلی لیتر رسانده شد.

❖ TBE buffer 10X :

۵۴ گرم تریس و ۲۷/۵ گرم اسیدبوریک را در ۶۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و سپس ۲۰ میلی لیتر EDTA (0.5 mM) به آن اضافه و به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر رسانده شد.

❖ TBE buffer 1X :

۵۰ میلی لیتر از بافر 10X را به ۴۵۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه می کنیم یا در حجم بالاتر ۱۰۰ میلی لیتر از بافر 10X را به ۹۰۰ میلیتر آب مقطر اضافه می کنیم.

❖ محاسبه نیروی g برای انجام سانتریفیوژ را می توانید از فرمول زیر محاسبه کنید.

$$RCF = 1.12 \times r \times \left(\frac{rpm}{1000}\right)^2$$

RCF: نیروی نسبی سانتریفیوژ می باشد که واحد آن بر اساس ضریبی از شتاب زمین (g) می باشد

rpm: سرعت چرخش سانتریفیوژ بر حسب دور در دقیقه

r: شعاع سانتریفیوژ بر حسب سانتی متر

Abstract:

Background & Objective: *Staphylococcus aureus* especially methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains are a major cause of nosocomial and community acquired infections with high morbidity and mortality rates worldwide. The role of integrons is unclear in the spread of antibiotic resistance genes among Gram-positive, such as *S. aureus* when compared with Gram-negative. The aims of this study were to determine MRSA and multi-drug resistant (MDR) isolates and detect the class 1, 2, and 3 integrons among clinical isolates of *S.aureus*.

Methods: 230 non-duplicated clinical isolates of *S. aureus* were collected from inpatients of teaching hospitals in two provinces. Antimicrobial susceptibility of *S. aureus* to 16 different antibiotics was performed using the disk diffusion according to CLSI guidelines. Genomic and plasmidal DNA of all isolates were extracted using two separate Extraction Kit (Bioneer-Korea) and polymerase chain reaction (PCR) assay was used for detection of class 1, 2, and 3 integron genes.

Results: Out of the 230 *S. aureus* isolates, 136 (59.1%) isolates were MRSA and 141 (61.3%) isolates exhibited the MDR pattern. PCR and sequencing showed that 57 (24.8%) of tested isolates were found to carry class 1 integron. Among the isolates investigated, MRSA and MDR isolates showed frequencies of 56.1% and 57.9%, respectively. Class 2 and 3 integrons were not 1 detected in any of the 230 isolates. In the analysis between the presence of class 1 integron and antibiotic resistance phenotype tests, there was no correct meaningful correlation (P value >0.05).

Conclusion: The *IntI1* gene was present in approximately one-quarter of this study isolates. The high prevalence rate of MRSA and MDR isolates and concurrently the presence of class 1 integron among those isolates has been considered an important concern in medical society.

Key Words: *Staphylococcus aureus*, MRSA, multi-drug resistance, integrons.



Qazvin University of Medical Sciences

Faculty Medicine

Thesis Submitted for the Master of Science (MSc)

Title:

**Frequency of classes 1, 2, and 3 integrons among multi-drug
resistance and methicillin resistant clinical isolates of *Staphylococcus
aureus* from inpatients in educational hospitals of
Qazvin and Tehran**

Supervisor: Dr. Masoumeh Aslanimehr

Advisor: Dr. Amir Peymani

By: Moein Yeylagh Beygi

Date of graduation: Summer 2015

Registration number: 57